

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
FEDERICO II**



**DOTTORATO INTERPOLO IN BIOETICA  
XXII CICLO**

**Studio di *markers* cellulari per il biomonitoraggio  
ambientale marino e implicazioni bioetiche**

Coordinatore

Prof. Giuseppe Lissa

Candidata

Dott.ssa Filomena Basile

Tutor

Prof.ssa Alessandra Pica

Anno Accademico 2008/2009

## ***Indice***

Introduzione .....	1
--------------------	---

### **Capitolo 1 - ETICA E AMBIENTE**

1.1 Etica e ambiente.....	3
1.2 Linee guida internazionali per la tutela dell'ambiente.....	13
1.3 Biomonitoraggio.....	19
1.4 Considerazioni etiche sull'impiego di animali nella sperimentazione scientifica.....	23
1.4.1 Il concetto di “modello” nella sperimentazione scientifica.....	24
1.4.2 Il benessere degli animali impiegati nella sperimentazione.....	25
1.4.3 Aspetti normativi del benessere degli animali impiegati nella sperimentazione.....	28

### **Capitolo 2 – IDENTIFICAZIONE DI MARCATORI BIOLOGICI DI DANNO IN SPECIE ANIMALI**

2.1 Il recettore 1 della transferrina.....	31
2.2 Il recettore 2 della transferrina.....	35
2.3 Il recettore della transferrina e il danno da irradiazione nel ratto.....	37
2.4 Il recettore della transferrina e il danno da irradiazione nell'uomo.....	39
2.5 Implicazioni dei risultati ottenuti.....	40
2.6 La glicoforina A.....	42
2.7 La glicoforina A quale <i>biomarker</i> del danno da irradiazione nell'uomo...	44

### **Capitolo 3 - LE TORPEDINI E IL DANNO DA IRRADIAZIONE**

3.1 Le torpedini.....	46
3.2 Le cellule del sangue circolante delle torpedini.....	47
3.3 Cenni sull'eritropoiesi delle torpedini.....	50

3.4 Il danno da irradiazione negli Elasmobranchi.....	52
---	----

## **Capitolo 4 – MATERIALI E METODI**

4.1 Articolazione del lavoro sperimentale.....	54
4.2 Esemplari utilizzati nel progetto di ricerca.....	56
4.3 Irradiazione.....	59
4.4 Citometria a flusso.....	60
4.5 Microscopia ottica a fluorescenza.....	61
4.6 Microscopia ottica.....	62
4.6.1 May Grünwald Giemsa.....	62
4.6.2 Fissazione con metanolo.....	63
4.6.3 Reazioni immunocitochimiche.....	63
4.7 Microscopia elettronica.....	66
4.7.1 Fissazione e inclusione.....	66
4.7.2 Immunolettromicroscopia per il TfR.....	67
4.7.3 Immunolettromicroscopia per la GPA.....	68

## **Capitolo 5 – RISULTATI**

5.1 Risultati per il recettore della transferrina (TfR).....	70
5.1.1 Citofluorimetria.....	70
5.1.2 Microscopia a fluorescenza.....	79
5.1.3 Microscopia ottica.....	79
5.1.4 Microscopia elettronica.....	82
5.2 Risultati per la glicoforina A (GPA).....	83
5.2.1 Citofluorimetria.....	83
5.2.2 Microscopia a fluorescenza.....	84
5.2.3 Microscopia ottica.....	84
5.2.4 Microscopia elettronica.....	85

Tavola 1.....	86
Tavola 2.....	88
Tavola 3.....	90
Tavola 4.....	92
Tavola 5.....	94
Tavola 6.....	96

## **Capitolo 6 – DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

6.1 Il recettore della transferrina (TfR).....	98
6.2 La glicoforina A (GPA).....	104
6.3 Considerazioni finali.....	106

<i>Bibliografia</i> .....	107
---------------------------	-----

<i>Sitografia</i> .....	116
-------------------------	-----

## ***Introduzione***

L'esistenza di una questione ambientale è ormai accertata ed è di grande interesse per le comunità locali, per i singoli Stati e gli enti sovranazionali, che sono impegnati sia nell'elaborazione di nuove linee-guida dell'etica ambientale, che possano individuare e/o ristabilire le corrette relazioni tra Uomo e Natura, sia nella pianificazione e realizzazione di interventi volti alla protezione e al recupero della Natura stessa. L'uomo è parte della Natura, e in quanto tale ogni sua azione ha effetti sull'ambiente; non a caso, alcune cause di perturbazioni ambientali da parte dell'uomo risalgono a tempi remoti, ma l'interesse verso i problemi di alterazione degli equilibri naturali è cresciuto, in misura rilevante, solo nell'ultimo secolo, a causa degli effetti indotti dall'uso sconsiderato delle risorse naturali a sostegno di un eccezionale sviluppo tecnologico, senza precedenti nella storia. Il progresso per certi aspetti ha migliorato le condizioni di vita dell'uomo, ma per altri ha dato origine a molteplici problemi riguardanti la sopravvivenza sul nostro pianeta: siano sufficienti, come esempio, l'inquinamento ambientale, in ogni sua forma, la riduzione della biodiversità, o lo sviluppo demografico, ove non proporzionato alle risorse disponibili. Questi stravolgimenti degli equilibri naturali non richiedono solo un radicale ripensamento dei sistemi di produzione e di consumo, ma anche una rinnovata attenzione per il monitoraggio dei sistemi naturali, onde rilevare le alterazioni prodotte dalle attività antropiche e pianificare gli adeguati interventi di recupero. Tra i sistemi più innovativi di monitoraggio ambientale, va annoverato il

*biomonitoraggio*, l'insieme delle metodologie che utilizzano esseri viventi per trarre informazioni sullo stato dell'ambiente. Il presente studio sperimentale, nell'ambito del corso di Dottorato di Ricerca in Bioetica, è stato rivolto all'identificazione di *markers* di danno cellulare di facile monitoraggio su organismi bioindicatori di inquinamento, al fine di mettere a punto un sistema di biomonitoraggio che non fosse invasivo. A tale scopo è stato scelto un modello di Vertebrato marino, la torpedine, che ha vita bentonica, abbastanza stanziale da poter costituire un bioindicatore di inquinamento di una zona costiera circoscritta. Quali *markers* di danno cellulare da inquinamento sono state scelte molecole di membrana dei globuli rossi, che, nell'uomo, sono state dimostrate sensibili agli insulti in particolare di tipo radioattivo.

## ***Capitolo 1***

### ***ETICA E AMBIENTE***

#### ***1.1 Etica e ambiente***

Una crescente preoccupazione per la salvaguardia degli equilibri naturali, a fronte di un evidente peggioramento dello stato di salute del nostro pianeta, richiede uno sforzo più intenso ed una sinergia più efficace nei progetti e nelle attività dei singoli e delle Nazioni; non solo, essa impone la necessità di un ripensamento dei principi e delle linee guida che orientano le scelte di carattere politico, economico ed *etico* della comunità umana.

Un atteggiamento forse troppo ciecamente fiducioso nei confronti delle potenzialità della scienza e dei successi della tecnica ha limitato la capacità di osservare e stimare gli effetti di un impiego delle risorse naturali che va oltre le necessità strettamente legate alla sopravvivenza, legandosi a logiche di sfruttamento e di accrescimento illimitato del profitto materiale, come strumento di dominio di pochi sulla Natura e sugli altri. In quest'ottica, la Natura è rivestita di un valore puramente materiale, quantificabile, monetizzabile, è oggetto nelle mani dell'uomo per l'appagamento dei suoi bisogni o per il consolidamento del suo potere.

Alla luce di questo atteggiamento culturale, che mette a rischio la sopravvivenza di innumerevoli specie animali e vegetali e la salute dell'uomo

stesso, e che in definitiva tiene sospesa ad un filo sempre più sottile la possibilità di mantenere gli equilibri naturali – già in parte infranti - all'interno della Biosfera e tra questa e le altre Sfere (Atmosfera, Idrosfera, Litosfera), si impone con urgenza la necessità di ripensare ai rapporti Uomo-Natura in un'ottica non esclusivamente o non eminentemente utilitaristica.

Al momento attuale, non sembra essere più in discussione la necessità di correggere la nostra condotta in relazione alla gestione delle risorse ed alla valutazione dei rischi ambientali derivanti dalle attività umane, quanto piuttosto l'entità di tale correzione ed il suo impatto sulla nostra visione del mondo e sul nostro approccio alla Natura: bisogna dunque capire se sarà sufficiente valutare con maggiore accuratezza e coscienza gli effetti del nostro agire o se dovrà essere radicalmente rivista la posizione dell'Uomo nei confronti del mondo animato e inanimato.

L'etica ambientale diventa, pertanto, una disciplina fondamentale, come etica della conservazione della vita sulla terra, ed inoltre in una prospettiva che sia sintesi di culture anche molto distanti tra loro. Essa ha, innanzitutto, il compito di mettere in discussione il ruolo dell'Umanità che si è venuto delineando nelle società occidentali e con esso l'idea che fondamentalmente permea il nostro pensiero, quella idea per cui il progresso scientifico e tecnologico ha nel suo avanzamento la giustificazione e la liceità di ogni suo atto ed ogni suo effetto. La scienza si pone l'obiettivo di migliorare la qualità della vita umana, mettendo a punto un programma di dominio sistematico nei



confronti del mondo naturale, espressione dell'istinto di affermazione dell'uomo, che così abbandona progressivamente il *tempo biologico*, per vivere entro un tempo dettato da ritmi programmati e finalizzati al progresso (La Torre, 1998).

Il concetto di Natura può sottendere, fondamentalmente, due categorie di analisi: il rapporto Uomo-Natura o il concetto di sviluppo. Relativamente al rapporto Uomo-Natura, due sono le posizioni principali: la visione antropocentrica, in base alla quale l'Uomo è superiore a tutti gli altri esseri viventi ed, in quanto tale, portato a dominare la Natura, ed il modello partecipativo, per cui l'Uomo, al pari degli altri viventi, è parte del complesso mondo naturale, nel quale però egli ha una diversa prospettiva e consapevolezza. Relativamente alla categoria dello sviluppo, si riconoscono un modello fissista, che considera la natura immutabile e compiuta perfezione e vede, di conseguenza, ogni mutamento come fonte di squilibrio, compresa ogni forma di intervento umano, ed il modello evoluzionista, enunciato per la prima volta da Charles Darwin nel suo libro "L'origine delle specie" del 1859, in virtù del quale tutto ciò che è vita, compreso l'uomo, ed anche le relazioni tra gli esseri viventi sono in continua evoluzione. Alla luce del pensiero evoluzionista, anche lo sviluppo scientifico e tecnologico possono essere considerati espressione dell'evoluzione della specie umana [1].

Il modello partecipativo, dunque, tende a considerare l'uomo come *parte della Natura* e non dominatore. Uno sviluppo di questa tendenza è l'attuale

consapevolezza dei danni arrecati all'ambiente e delle relative responsabilità morali; tale consapevolezza è intimamente connessa al riconoscimento che la Natura non è né limite - in quanto l'uomo ha imparato a controllarne in buona parte i fenomeni, e può egli stesso influire in maniera decisiva sulla sua evoluzione - né oggetto, in quanto non è possibile considerarla semplicemente come "altro" rispetto all'Umanità: l'Uomo è *parte* della Natura. L'Uomo non è *responsabile* dell'*esistenza* della Natura in senso proprio, non ne è l'artefice, ma è pur vero che la sua presenza sul pianeta è sempre più incisiva – in relazione all'evoluzione scientifica e tecnologica – di quella degli altri esseri viventi, che risulta al contrario pressoché costante: l'Uomo, di fatti, è in grado di modificare radicalmente gli equilibri naturali, capacità che sfugge a qualsiasi tentativo di paragone con le altre specie.

È quanto mai necessario ridisegnare la rotta, correggere la direzione del nostro itinerario, e forse comprendere che, durante il cammino, il percorso merita più attenzione della meta. Forse è giunto il momento che l'Uomo inizi a considerarsi ospite gradito di una Terra presa in prestito dalle generazioni future, da mantenere e riconsegnare intatta ai posteri.

L'Uomo, in quanto parte della Natura e dotato di capacità di pensiero e di azione praticamente superiori a quelle di ogni altro vivente sul pianeta, è chiamato ad assumere un atteggiamento *responsabile* nei confronti della propria specie e delle altre; da tale atteggiamento conseguono dei *doveri ecologici*, in primis quello di progettare una crescita sostenibile. Più in generale, un mondo

sostenibile è un mondo in cui le attività antropiche non indeboliscono o distruggono i delicati equilibri naturali, ma se da un lato mirano allo sviluppo economico, all'aumento della produttività dei suoli, all'approvvigionamento di fonti energetiche che possano far fronte ad una richiesta in costante aumento – che alimenta il progresso tecnologico e ne è alimentato – dall'altro le attività dell'Uomo, in un mondo sostenibile, devono essere affiancate dalla ricerca di nuove soluzioni che possano preservare gli equilibri naturali, mantenere inalterato il complesso sistema del nostro pianeta o lasciare che esso stesso, spontaneamente, tenda a nuove forme di equilibrio e di autoconservazione.

Ritornando brevemente sul concetto di *responsabilità*, la stessa etimologia del termine, derivante dal latino *res-pondere*, soppesare una cosa, un'azione o un evento, indica che ha un atteggiamento responsabile chi, prima di compiere un'azione, prende in considerazione le possibili conseguenze, almeno quelle prevedibili, delle proprie azioni, sapendo che ve ne possono essere anche alcune non prevedibili. Il primo fondatore dell'*etica della responsabilità* fu Max Weber, sociologo tedesco che tra fine Ottocento e inizio Novecento elaborò il concetto di etica della responsabilità, in contrapposizione all'etica dell'intenzione tipicamente kantiana. “Ogni agire orientato in senso etico può oscillare tra due massime radicalmente diverse e inconciliabilmente opposte: può esser cioè orientato secondo l'«etica dell'intenzione» oppure secondo l'«etica della responsabilità». Non che l'etica dell'intenzione coincida con la mancanza di responsabilità e l'etica della responsabilità con la mancanza di

convinzione. Non si vuol certo dir questo. Ma v'è una differenza incolmabile tra l'agire secondo la massima dell'etica dell'intenzione, la quale – in termini religiosi – suona: «Il cristiano opera da giusto e rimette l'esito nelle mani di Dio», e l'agire secondo la massima dell'etica della responsabilità, secondo la quale bisogna rispondere delle conseguenze (prevedibili) delle proprie azioni” (Weber, 1973). Dunque, secondo l'etica della responsabilità, il criterio che orienta l'azione umana non è l'intenzione dell'uomo né lo scopo dell'azione stessa, ma l'insieme delle conseguenze che da essa scaturiscono. La precisazione di Weber sull'esistenza di effetti non prevedibili può anche essere considerata alla base del *principio di precauzione*, la cui applicazione è sempre più auspicabile, ad esempio, nell'impiego delle biotecnologie, quando non si hanno garanzie di completa assenza di impatto ambientale.

Il principio responsabilità è stato ripreso da Hans Jonas, nel libro intitolato "Il Principio Responsabilità", edito nel 1979, come principio cardine di un'etica razionalista applicata alla bioetica, in particolare ai temi dell'ecologia, un'etica del futuro, per cui l'uomo *deve* compiere le sue scelte in funzione delle conseguenze, il cui imperativo è: "Agisci in modo tale che gli effetti della tua azione siano compatibili con la continuazione di una vita autenticamente umana".

Una cultura della salvaguardia responsabile dell'ambiente dovrebbe rifiorire, a partire dalle nuove generazioni, come auspicato dal Comitato Nazionale di Bioetica (CNB), che suggerisce la definizione di un nuovo

“programma nazionale di pedagogia ambientale (da attuare nella scuola, nei servizi, nel mondo del lavoro anche valorizzando l'opera delle formazioni spontanee) in modo da radicare nelle nuove generazioni i valori ecologici come parte integrante della formazione professionale, per la salvaguardia del bene comune e dei diritti del singolo” [2]. Inoltre, al fine di incentivare i cambiamenti dei sistemi di produzione e consumo, che conducono all'esaurimento delle risorse non rinnovabili e alle trasformazioni irreversibili alle quali il mondo naturale non è in grado di opporsi, il CNB fa appello ai principi generali di socialità, responsabilità e sussidiarietà [2].

È evidente che i grandi sconvolgimenti che da qualche decennio investono la Terra, a partire dall'inquinamento a tutti i livelli, dai mutamenti climatici planetari, dalla silente riduzione della biodiversità, dalla mancata tutela di aree e specie protette, per arrivare all'abusivismo edilizio, alla cementificazione selvaggia e allo sversamento di rifiuti comuni e speciali, altamente tossici, nel suolo - per citare un fenomeno criminale che mi riguarda drammaticamente da vicino, in qualità di abitante della regione Campania ed in particolare del comune di Giugliano in Campania (Na) – rientrano in una concezione non solo meramente antropocentrica, ma anche utilitaristica e criminale del rapporto con il mondo biotico ed abiotico, nello sprezzo più totale dalla salute e dell'incolumità propria ed altrui. Gli ingenti profitti economici a breve termine, per affaristi senza scrupoli ed amministratori corrotti, sono evidentemente prioritari rispetto ai rischi a breve, medio e lungo termine per la vita propria ed

altrui, basti pensare ad eventi drammatici, verificatisi negli ultimi mesi, quali l'alluvione di Giampilieri (ME, 1 ottobre 2009) e la frana nel comune di Casamicciola (isola di Ischia, NA, 10 novembre 2009), entrambi riconducibili, verosimilmente, al dissesto idrogeologico del territorio, causato da abusivismo edilizio e mancanza di controlli. Dopo la prima alluvione che devastò Giampilieri superiore, nel 2007, i tecnici della Protezione civile, presentarono un rapporto choc ai pm, nel quale si leggeva: “la causa scatenante le forti alluvioni è stata certamente l'elevata intensità di eventi meteorici, ma non può non essere presa in considerazione la leggerezza di alcune scelte territoriali, che si sono rilevate determinanti negli effetti provocati dal dissesto idrogeologico. Scelte che hanno fatto sì che il degrado dei corsi idrici del messinese diventasse un fenomeno ormai generalizzato e diffuso capace di provocare un vero e proprio disastro”. Carmelo Gioè, geologo al Comune di Messina, su richiesta della Regione Sicilia a tutti i Comuni, inviò agli uffici regionali di competenza l'aggiornamento del PAI, Piano di Assetto Idrogeologico, con un nuovo esame delle aree a rischio del territorio comunale e la segnalazione di interventi prioritari. Il geologo sottolineava che “la mancata attribuzione di un livello di pericolosità e di rischio fa sì che risulti rimandata a tempi successivi la scelta di una corretta politica di pianificazione territoriale e di mitigazione del rischio idraulico”. I fatti del 2009 hanno dimostrato che gli interventi di messa in sicurezza del territorio, richiesti alla Regione, non sono stati mai realizzati [3]. Il prof. Antonio Praturlon, del Dipartimento di Scienze Geologiche, Università

Roma Tre, nell'esprimere, in altro contesto, la sofferenza per lo scempio del paesaggio nel nostro Paese, parla di "ingessamento dell'intero nostro territorio, dove i fiumi non hanno più valvole di sfogo nelle pianure alluvionali, le spiagge non ricevono più materiali dai fiumi, le falde idriche si impoveriscono, i versanti instabili non sono neppure più liberi di franare per rimettersi in equilibrio [...]: un territorio giovane, dinamico, l'Italia, che non è più libero di seguire la sua evoluzione naturale" [4].

Indubbiamente, come ricordato da S. Patresi, studioso di Filosofia del Diritto e delle interconnessioni tra Diritti Umani, Bioetica, Diritto Internazionale e Pedagogia, nella realtà dei fatti, le scelte dell'uomo, in generale, sono originate dall'intersezione, spesso sbilanciata, di considerazioni di ordine giuridico, politico, economico ed etico-morale-religioso. Il criterio giuridico fa riferimento all'insieme delle scelte normative, con la contrapposizione valido-invalido; quello politico, con il dualismo efficace-non efficace, costituisce l'insieme delle scelte per la risoluzione di problemi; quello economico tiene conto delle relazioni economiche, con la contrapposizione utile-disutile; infine quello etico-morale-religioso, con la contrapposizione giusto-ingiusto, risponde a tutto il complesso di comportamenti morali, di diversa origine, derivanti ad esempio da scelte individuali, convinzioni religiose o regole sociali. Raramente le azioni e le scelte umane sono tali da conservare un equilibrio tra questi quattro "mondi", come li definisce l'Autore, anzi generalmente scegliere significa creare uno

squilibrio: infatti, difficilmente una scelta è contemporaneamente valida, efficace, utile e giusta allo stesso tempo [5].



## ***1.2 Linee guida internazionali per la tutela dell'ambiente***

La coscienza e l'attenzione dell'opinione pubblica internazionale sulle questioni riguardanti la tutela dell'ambiente, e di quello marino in particolare, furono scosse nel 1967 dal naufragio della petroliera liberiana Torrey Canyon, con 80.000 tonnellate di petrolio greggio a bordo, al largo della Cornovaglia, e la conseguente decisione delle Autorità inglesi di incendiare il petrolio fuoriuscito, con la giustificazione di evitare, nello stato di necessità, ulteriori danni alle coste inglesi e francesi. Le leggi allora esistenti dovevano essere evidentemente inadeguate alla raggiunta evoluzione tecnologica nel campo della produzione e del trasporto del petrolio greggio; inoltre, in quel periodo, la probabilità che si verificassero incidenti del genere era evidentemente più alta che in precedenza, a causa dell'elevata richiesta di idrocarburi ed altre sostanze potenzialmente molto inquinanti, in un'era di forte ripresa economica. Di fatti, da allora sono stati innumerevoli i naufragi di petroliere in ogni parte del pianeta, tra i più gravi: l'incidente dell'Exxon Valdez in Alaska (1989); la fuoriuscita di 50.000 tonnellate di greggio dalla Haven,, al largo delle coste genovesi (1991); il naufragio della Erika al largo delle coste della Francia (1999); il naufragio della Jessica al largo dell'arcipelago delle Galapagos (2001) (Quotidiano "Repubblica", 12 novembre 2002).

Dal 1969, due anni dopo l'incidente della Torrey Canyon, numerose furono le convenzioni stipulate, a livello mondiale e locale, in materia di protezione ambientale. "Siamo arrivati ad un punto della storia in cui dobbiamo

regolare le nostre azioni verso il mondo intero, tenendo conto innanzitutto delle loro ripercussioni sull'ambiente", così recita la dichiarazione finale della Conferenza di Stoccolma del 1972, segnando a livello mondiale la nascita della presa di coscienza di un approccio globale alla tutela ambientale.

Il principio fondamentale del danno ambientale è stato introdotto nella legge di attuazione della Convenzione di Londra del 2 novembre 1973, proprio sulla prevenzione dell'inquinamento causato da navi: in particolare, si stabiliva la responsabilità oggettiva e solidale del proprietario e del comandante della nave non solo per "il rimborso delle spese sostenute per la pulizia delle acque e degli arenili" ma anche per il risarcimento dei "danni arrecati alle risorse marine", cioè il danno ambientale vero e proprio. Tra le numerose altre del periodo, rilevante è la Convenzione di Montego Bay sul diritto del mare del 1982, in vigore dal 1994: definita la zonazione delle aree marine, essa regola tutti gli spazi marini e le attività che si svolgono negli stessi. Ai singoli Stati è riconosciuto il diritto sovrano di sfruttare le proprie risorse naturali (art. 193), con l'obbligo di proteggere e preservare l'ambiente marino (art. 192) e di prevenire l'inquinamento marino, anche mediante cooperazione con altri Stati (art. 197). Tale convenzione segna un punto di svolta per la legislazione in materia di protezione ambientale, essenzialmente per il fatto che costituisce un primo complesso di norme omogeneo ed unitario: tuttavia, molti dei 155 Stati firmatari ancora non l'hanno ratificata (in Italia la Convenzione è stata ratificata con la Legge 689/1994).

Nella Dichiarazione finale del Summit della Terra di Rio de Janeiro (Conferenza delle Nazioni Unite su Ambiente e Sviluppo, 1992), sottoscritta da 170 Paesi (ma non dagli Stati Uniti), viene ulteriormente definito l'obbligo, per i soggetti responsabili dell'inquinamento e non per la società nel suo complesso, di sostenere i costi necessari per evitare e riparare i danni all'ambiente. L'articolo 16 prevede che "le autorità nazionali dovranno tentare di promuovere l'internalizzazione dei costi per la tutela ambientale e l'uso di strumenti economici, considerando che l'inquinatore dovrebbe, in principio, sostenere i costi del disinquinamento con il dovuto rispetto nei confronti dell'interesse pubblico e senza danneggiare il commercio e gli investimenti internazionali".

Se nei decenni precedenti maturava una coscienza dei diritti dell'ambiente, è con il Protocollo di Kyoto, il primo trattato globale legalmente vincolante, approvato dalla Conferenza delle Parti (COP) nel dicembre 1997 ed aperto alla firma il 16 marzo 1998, che si compie un notevole progresso verso politiche ambientali più operative anche sul piano internazionale, mirate principalmente al miglioramento dell'efficienza energetica e alla riduzione dell'inquinamento atmosferico e dell'effetto serra, causati dalle elevate concentrazioni di anidride carbonica, con la riduzione delle emissioni di tale gas e l'aumento della capacità di assorbimento dello stesso.

Al 1997 risale anche la "Dichiarazione delle Nazioni Unite sulle responsabilità delle generazioni presenti verso le generazioni future", esito finale della conferenza generale dell'Organizzazione delle Nazioni Unite per

l'Educazione, la Scienza e la Cultura (UNESCO) riunitasi a Parigi. All'articolo 5, sono enunciate le direttive in tema di protezione dell'ambiente: compito delle generazioni presenti è quello di “agire per uno sviluppo durevole e preservare le condizioni della vita e in particolare la qualità e l'integrità dell'ambiente”, al fine di lasciare alle generazioni future un mondo che mantenga tutta la ricchezza dei vari ecosistemi della Terra, nel quale non vi siano rischi per la salute o l'esistenza stessa di coloro che lo abiteranno, ma siano garantite le risorse naturali indispensabili per lo sviluppo e la continuazione della specie umana. In sintesi, le generazioni presenti devono valutare sempre le conseguenze di ogni scelta o progetto per le generazioni future.

Successivamente, nel 2000, viene adottata la Carta della Terra (The Earth Charter), una dichiarazione universale sui diritti e doveri degli esseri umani nei confronti dell'ambiente naturale, frutto di un dialogo decennale, mondiale, interculturale su obiettivi e valori comuni, basata sul concetto di sviluppo sostenibile e sulla volontà di costruire una società globale equa, sostenibile e pacifica, fondata su principi etici condivisi a livello internazionale. Il progetto della Carta della Terra cominciò a maturare negli anni in seno all'ONU, si completò con un'iniziativa della società civile e fu lanciata come “Carta” dalla Commissione della Carta della Terra, un organismo internazionale indipendente. “I partecipanti includono istituzioni internazionali, governi nazionali e loro agenzie, università, organizzazioni non governative e comunità, governi locali,

gruppi religiosi, scuole e imprese, così come migliaia di persone a livello individuale” [6].

Nel 2002, a dieci anni dal Summit di Rio de Janeiro, si tenne a Johannesburg, Sud Africa, la Conferenza sull'Ambiente e lo Sviluppo delle Nazioni Unite, alla quale parteciparono 172 governi e 108 capi di Stato o di Governo, 2.400 rappresentanti di organizzazioni non governative e oltre 17.000 persone. "The Johannesburg Declaration on Sustainable Development from our origins to the future", il documento finale della Conferenza, esprime la volontà e necessità di raggiungere obiettivi fondamentali per l'uomo e l'ambiente: primo fra tutti, la nuova sfida per uno sviluppo sostenibile, che possa coniugare gli aspetti economici, ambientali e sociali, attraverso un cambiamento radicale degli attuali modelli di produzione e consumo, considerati 'insostenibili', e la protezione e la corretta gestione delle risorse naturali.

Il lungo percorso della presa di coscienza di una questione ambientale, e della necessità di affrontarla e risolverla, giunge finalmente ad un approccio olistico alle problematiche economiche ed ambientali, rivelando la necessità della tutela dell'ambiente nell'ambito del progresso scientifico, tecnologico ed economico.

Per quanto concerne le normative europee in materia di ambiente, va notato che esse comprendono globalmente, nella definizione di ambiente, sia elementi naturali tradizionali, quali suolo, aria, acqua, aria, fauna, flora, paesaggio, sia elementi derivanti dall'interazione uomo-ambiente, e comunque

ric conducibili alla materia ambientale, quali salute, sicurezza alimentare (ad es., gli OGM), condizioni di vita dell'uomo etc. Il principio fondamentale, riportato nell'art. 6 del Trattato CE, consiste nell'obbligo di considerare sempre, in qualsiasi iniziativa comunitaria, le esigenze relative alla tutela dell'ambiente. L'Unione Europea promuove inoltre tutte quelle iniziative volte a sensibilizzare e responsabilizzare la popolazione nei confronti dell'ambiente, affinché la sua tutela non derivi solo da norme o provvedimenti istituzionali, ma da un comportamento corretto e consapevole dei cittadini nella vita quotidiana, come ad esempio la scelta di prodotti e servizi eco-compatibili, meditata sulla base del loro impatto ambientale.

### ***1.3 Biomonitoraggio***

In considerazione di quanto già detto, nasce una rinnovata esigenza di salvaguardia ambientale, attraverso specifici programmi di prevenzione del danno ambientale e di monitoraggio degli ecosistemi naturali. Accanto ai sistemi di monitoraggio “tradizionali” e già ampiamente utilizzati, quali ad esempio le centraline per la misurazione delle polveri sottili nell’atmosfera collocate nelle aree urbane, o le stazioni di campionamento delle acque in ambiente marino, fluviale o lacustre, recentemente si registra una tendenza all’impiego di sistemi di *biomonitoraggio*. Il termine biomonitoraggio (o monitoraggio biologico) viene utilizzato per indicare l’insieme delle metodologie che studiano lo stato di salute dell’ambiente attraverso l’impiego di organismi viventi. Più precisamente, il biomonitoraggio è lo studio delle risposte biologiche evidenziate dall’alterazione fisiologica degli organismi impiegati, dovute alle modificazioni ambientali, di origine naturale o antropica. Tale studio mira a fornire una ricostruzione dell’ambiente monitorato completa e complessa, per consentire la progettazione di efficaci interventi di recupero ambientale e programmi di sviluppo ecosostenibili, nell’ambito di strategie complesse di protezione degli ecosistemi terrestri, marini, fluviali e atmosferici. Nelle metodologie del biomonitoraggio si possono distinguere due diverse tipologie di organismo test: i *bioindicatori*, organismi che subiscono variazioni evidenti nella fisiologia, nella morfologia o nella distribuzione sotto l’influsso delle sostanze presenti nell’ambiente, ed i *bioaccumulatori*, organismi in grado di sopravvivere in

presenza di inquinanti che accumulano nei loro tessuti, dai quali è possibile ottenere dati sia di tipo qualitativo sia quantitativo. Un esempio di biomonitoraggio può essere lo studio dell'espressione di molecole specifiche in organismi opportunamente scelti (bioindicatori), allo scopo di valutare eventuali alterazioni dell'ambiente in cui tali organismi vivono. Simili studi sono in linea con le direttive dell'UNEP (United Nations Environmental Protection) e dell'EPA (European Protection Agency), che prevedono l'integrazione delle analisi chimiche, fisiche ed ecologiche con metodiche di biomonitoraggio, mediante utilizzo di organismi sentinella e *biomarkers*. Gli organismi sentinella sono scelti in funzione della particolare sensibilità agli stress ambientali, in conseguenza dei quali modificano entro breve tempo alcune caratteristiche enzimatiche, fisiologiche e citologiche, mantenendosi tuttavia vitali: per questo si prestano particolarmente bene alla funzione di "sentinelle ambientali" per programmi di biomonitoraggio. In questi casi, lo stato di salute degli organismi viene valutato tramite analisi di specifici parametri fisiologici, biochimici e morfologici (i *biomarkers*) il cui valore si modifica con l'accrescersi degli effetti tossici degli inquinanti. Secondo la definizione del National Research Council, un *biomarker* è "una variazione indotta da un contaminante nei componenti di un processo, di una struttura o di una funzione dell'organismo che possa essere misurata in un sistema biologico" (NRC, 1989). In maniera più diretta, il termine *biomarker* individua una serie di risposte biologiche, determinate da fattori di stress quali gli agenti inquinanti, misurabili in maniera ripetibile e



relativamente semplice a livello cellulare, tissutale, o dell'intero organismo. Un *biomarker* è in grado di fornire informazioni sia qualitative che semiquantitative non solo sul tipo di insulto chimico, ma anche sulla correlazione tra il livello di inquinamento ambientale e i conseguenti effetti biologici. Inoltre, è stato visto che un contaminante può avere effetti biologici a vari livelli di organizzazione strutturale (Bayne et al., 1985). Il primo livello interessato dalla tossicità primaria di un agente inquinante è quello molecolare, ad esempio un agente contaminante può indurre alterazioni del DNA o modificazioni di attività enzimatiche. Da questi effetti primari derivano, successivamente, alterazioni ai livelli successivi di organizzazione, quali strutture sub-cellulari, cellule, tessuti, organi, sistemi, organismi, popolazioni. A tutti questi livelli, le modificazioni indotte dall'agente contaminante generano una risposta all'insulto perturbatore: tale risposta costituisce un *biomarker*, da valutare nell'ambito di indagini ecotossicologiche (Depledge, 1989; McCarthy & Shugart, 1990).

Le tecniche di biomonitoraggio sono ormai ampiamente utilizzate e costituiscono uno strumento indispensabile per il controllo delle condizioni ambientali, ad esempio per l'accertamento di inquinamento da metalli pesanti in ambiente acquatico, mediante l'utilizzo, singolo o combinato, di diversi tipi di organismi bioindicatori: alghe, macrofite, zooplankton (protozoi, crostacei, anfipodi, copepodi), insetti, molluschi bivalvi e gasteropodi, pesci, anfibi, uccelli o mammiferi, quali foche e leoni marini (Zhou et al., 2008). Alcuni

organismi, per quanto sensibili alle variazioni ambientali, non sono bioindicatori estremamente attendibili, se non relativamente stanziali: ad esempio, sebbene sia possibile monitorare i livelli di mercurio in ambiente marino mediante l'analisi delle piume del falco pescatore (Odsjö et al., 2004), le informazioni ottenute da questa specie, tipicamente migratrice, non possono essere riferite con certezza ad una specifica area marina (Zhou et al., 2008). La stanzialità di una specie risulta pertanto una caratteristica fondamentale per la sua elezione ad organismo sentinella, in qualità di bioindicatore o di bioaccumulatore. Le torpedini, pur essendo delle abili nuotatrici, trascorrono gran parte del tempo adagate sui fondali e sono specie relativamente stanziali, pertanto idonee come bioindicatori se dimostrano suscettibilità alle modificazioni ambientali di interesse.

### ***1.4 Considerazioni etiche sull'impiego di animali nella sperimentazione scientifica***

Le questioni riguardanti la necessità della sperimentazione animale, nell'ambito della ricerca scientifica, e la sua accettabilità da un punto di vista etico, ovvero la sua liceità, sono ancora fortemente dibattute. I movimenti animalisti e antivivisezionisti propugnano la totale abolizione della sperimentazione animale: in alcuni casi, essa viene condannata aprioristicamente da un punto di vista etico, poiché ritenuta lesiva del diritto alla vita e al benessere degli animali; in altri casi la critica negativa è incentrata sull'affidabilità, o meglio sulla presunta inaffidabilità, dei risultati scientifici della sperimentazione animale, in quanto ottenuti su specie diverse da quella umana e, di conseguenza, non estendibili a quest'ultima. Di segno opposto è la posizione della comunità scientifica, che invece ritiene necessaria, utile ed accettabile la sperimentazione animale, in quanto appare impensabile che qualsiasi sperimentazione, ad esempio nell'ambito dello studio di un nuovo farmaco o della comprensione di un fenomeno fisiologico, possa essere condotta direttamente sugli esseri umani, senza passare attraverso una fase di sperimentazione animale. Del resto molte malattie, che affliggono sia gli uomini che gli animali, sono oggi curabili proprio grazie agli studi di fisiologia ed alla messa a punto di nuovi farmaci, impensabili se non condotti su animali.

#### ***1.4.1 Il concetto di “modello” nella sperimentazione scientifica***

Negli studi scientifici è di estrema importanza il concetto di “modello”: gli animali si utilizzano come "modelli" dell'uomo perché, pur essendo diversi, ne condividono molte caratteristiche fisiologiche, neuroendocrine, genetiche etc. Pertanto, nell'ambito della ricerca biomedica, molte volte è indispensabile passare attraverso una fase di sperimentazione animale. Naturalmente, nel corso degli ultimi decenni, con la maggiore sensibilità nei riguardi delle esigenze e del benessere degli animali, è maturata anche l'esigenza di sviluppare metodi alternativi alla sperimentazione animale, più vantaggiosi da un punto di vista etico e, talvolta, economico; essi si distinguono in:

- metodi biologici, quali i sistemi in vitro, che utilizzano materiale biologico di diversa origine, animale o umana, quali: microorganismi, colture cellulari, colture di tessuti e di organi;
- metodi non biologici, quali l'epidemiologia, la statistica, le banche dati e i sistemi di simulazione computerizzati.

Questi metodi alternativi, pur avendo il vantaggio di limitare l'impiego degli animali da laboratorio, non possono sostituire il livello di complessità e le interazioni cellulari presenti in un organismo *in toto*, pertanto la sperimentazione animale è da ritenersi necessaria nel campo della ricerca biomedica, in quanto ha contribuito, contribuisce e contribuirà ancora al benessere sia dell'uomo che degli animali: basti pensare a tutte quelle malattie che sono diventate curabili proprio grazie ai farmaci nati dalla ricerca su animali.

#### ***1.4.2 Il benessere degli animali impiegati nella sperimentazione***

Dalla necessità della sperimentazione animale scaturisce il dovere, giuridico e morale, di garantire il massimo rispetto degli animali utilizzati, in merito alle condizioni igieniche e sanitarie, alle esigenze biologiche e alle caratteristiche comportamentali delle singole specie. Il concetto di "benessere animale" applicato alle condizioni sperimentali, viene praticamente inteso come assenza di stress, dolore, angoscia e sofferenza per l'animale da sperimentazione. Del resto, gli stessi ricercatori sanno che, per garantire la qualità del lavoro sperimentale e l'affidabilità dei risultati, devono conoscere la biologia degli animali da laboratorio, le loro necessità di allevamento e ambientali, curare la standardizzazione delle procedure genetiche, la prevenzione e il trattamento delle malattie, ovvero l'ottimizzazione delle tecniche sperimentali e il miglioramento dell'anestesia, analgesia ed eutanasia: quindi, anche nell'ottica di un'ottimizzazione della sperimentazione, non devono essere esclusi gli aspetti etici intesi a diffondere la cultura del benessere animale.

Storicamente, un punto di svolta, nell'approccio dei ricercatori alla problematica del benessere degli animali impiegati nella sperimentazione scientifica, è stato segnato dalla pubblicazione, nel 1959, del libro "The Principles of Human Experimental Technique", in cui veniva per la prima volta enunciato il principio di Russel e Burch delle "3 R": Replacement (Sostituzione), Reduction (Riduzione) e Refinement (Raffinamento), tre concetti da utilizzare, e soprattutto tre metodi da attuare, per rendere eticamente più

accettabile la sperimentazione sugli animali. Nella fase di progettazione di ogni nuovo disegno sperimentale, il ricercatore dovrebbe chiedersi cosa può fare rispetto a ciascuna delle tre “R”:

- per il Replacement, potrebbe pensare di condurre i tests con metodi alternativi, come le colture in vitro o la simulazione computerizzata, se possibile;
- per la Reduction, dovrebbe valutare tutti i fattori in grado di ridurre al *minimo* il numero di animali richiesti dal progetto;
- per il Refinement, dovrebbe considerare e adottare tutte le misure atte a ridurre la sofferenza e lo stress degli animali da utilizzare comunque nella procedura.

Rispetto alla formulazione iniziale, il modello delle tre “R” è stato rivisto e reinterpretato nel corso del tempo. Ad esempio, oggi nell’ottica del Replacement si è sviluppata la tendenza ad utilizzare animali con un sistema nervoso meno complesso, quali Pesci ed Anfibi, dovuta sia alla necessità di utilizzare modelli di facile gestione e con tempi di risposta abbastanza rapidi, sia alla necessità etica di impiegare animali con il più basso grado di sviluppo neurologico.

In definitiva, il metodo delle tre “R” è un modello etico, in quanto punta a minimizzare la sofferenza e lo stress degli animali impiegati nella sperimentazione e ad evitare la perdita di vite animali, quando non sia possibile

in alcun modo sostituire gli animali con modelli sperimentali alternativi. Esso risponde inoltre alla regolamentazione legislativa in materia, attuata a livello europeo mediante la Direttiva CEE n.609/86 e recepita in Italia con il Decreto Legislativo n.116 del 27 gennaio 1992.

### ***1.4.3 Aspetti normativi del benessere degli animali impiegati nella sperimentazione***

Il D.L. 116/92 è il Testo di riferimento in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici in Italia. L'impiego degli animali (art. 3, comma 1) "è consentito solo per uno o più dei seguenti fini:

a) lo sviluppo, la produzione e le prove di qualità, di efficacia e di innocuità dei preparati farmaceutici, degli alimenti e di quelle altre sostanze o prodotti che servono:

1) per la profilassi, la diagnosi o la cura di malattie, di cattivi stati di salute o di altre anomalie o dei loro effetti sull'uomo, sugli animali o sulle piante;

2) per la valutazione, la rilevazione, il controllo o le modificazioni delle condizioni fisiologiche nell'uomo, negli animali o nelle piante;

b) la protezione dell'ambiente naturale nell'interesse della salute e del benessere dell'uomo e degli animali."

Il ricorso alla sperimentazione animale è ammesso solo quando non siano praticabili altri metodi scientifici validi che non richiedano l'impiego di animali (art. 4, comma 1); tra i vari esperimenti possibili, vanno preferiti quelli che hanno maggiori probabilità di fornire risultati soddisfacenti, richiedono il minor numero di animali - con il più basso livello di sviluppo neurologico - e causano meno dolore, angoscia e danni durevoli (art. 4, comma 2). Se gli esperimenti, da condursi in ogni caso sotto anestesia generale o locale (art. 4, comma 3), sono



tali da comportare forti dolori o angoscia agli animali, è vietato il riutilizzo dello stesso esemplare in un nuovo esperimento (art. 4, comma 4). Inoltre, il Decreto detta le norme fondamentali per la gestione e la stabulazione degli animali utilizzati nella sperimentazione (art. 5); stabilisce il principio in base al quale tutti “gli esperimenti devono essere effettuati in modo da evitare angoscia e sofferenza o dolore inutili agli animali” (art. 6, comma 1); impone, se compatibili con l’esperimento in corso, trattamenti analgesici per gli animali che manifestino sofferenza all’esaurimento dell’effetto dell’anestesia o la soppressione, se non è possibile la sopravvivenza dell’animale stesso in condizioni di benessere (art. 6, commi 2 e 4).

Echi del “Principio delle 3” sono ravvisabili nell’art. 17, in cui è stabilito che, nei piani di ricerca scientifica, sono da preferire metodi alternativi che non richiedono la sperimentazione animale o, se quest’ultima è inevitabile, progetti che impiegano un minor numero di animali e di specie e che comportano procedimenti meno dolorosi.

Sono autorizzati a compiere esperimenti su animali i ricercatori in possesso di laurea in medicina e chirurgia, medicina veterinaria, biologia, scienze naturali o altro titolo riconosciuto idoneo ed equivalente (art. 4, comma 5), opportunamente istruiti e formati (comma 6) ed in grado di manipolare e curare gli animali di laboratorio (comma 7).

I ricercatori, i medici, il personale sanitario dei ruoli dei professionisti laureati, tecnici ed infermieristici, nonché gli studenti universitari interessati,

possono esercitare l'obiezione di coscienza a qualsiasi atto connesso con la sperimentazione animale (Legge 413/1993, art. 1).

## ***Capitolo 2***

# ***IDENTIFICAZIONE DI MARCATORI BIOLOGICI DI DANNO IN SPECIE ANIMALI***

### ***2.1 Il recettore 1 della transferrina***

Il recettore della transferrina (TfR) è una glicoproteina di membrana coinvolta nel processo di assorbimento del ferro e nella regolazione della crescita cellulare (Neckers & Trepel, 1986), pertanto riveste un ruolo fondamentale per il metabolismo e l'omeostasi cellulare; inoltre è implicata nella regolazione della crescita di cellule normali e maligne. Il TfR è espresso in tutte le cellule normali, maggiormente nelle cellule che si caratterizzano per un'elevata velocità di proliferazione, quali ad esempio le cellule dell'epitelio basale dell'epidermide e dell'epitelio intestinale (Omary et al., 1980; Shindelman et al., 1981; Sutherland et al., 1981) e le cellule mononucleate attivate del sangue periferico (Goding & Burns, 1981; Haynes et al., 1981; Trowbridge, 1988). Il TfR è inoltre espresso in cellule che richiedono grandi quantità di ferro, quali i trofoblasti della placenta, le cellule responsabili del trasporto del ferro al feto, e le cellule eritroidi in via di maturazione che hanno bisogno del ferro per la sintesi dell'eme (Trowbridge, 1988); le cellule eritroidi mature, comunque, non esprimono il TfR. Non manca, in letteratura, la descrizione del TfR anche in cellule non proliferanti, tra le quali si annoverano

le cellule dell'endotelio vascolare dei capillari del cervello, del pancreas endocrino, dei tubuli seminiferi dei testicoli, dell'ipofisi, delle membrane luminali della mammella, degli epatociti, le cellule del Kupffer nel fegato e quelle dei tubuli renali (Gatter et al., 1983; Jefferies et al., 1985; Panaccio et al., 1987). Ridotta o assente è l'espressione del TfR sulle cellule staminali emopoietiche pluripotenti umane, di ratto o di topo (Bender et al., 1994; Gross et al., 1997), mentre le cellule progenitrici della linea eritroide nell'uomo e nel topo esprimono il recettore (Sieff et al., 1982; Lesley et al., 1984; Jefferies et al., 1985; Taetle, 1990).

È stato dimostrato che le variazioni del livello di espressione di questa glicoproteina sono correlate non solo ad un alterato metabolismo del ferro, ma anche a diversi tipi di neoplasie, ed in tal caso l'entità della variazione può assumere anche un significato prognostico (Daniels et al., 2006). La determinazione dei livelli ematici della forma solubile del recettore è impiegata per la diagnosi di alcuni stati anemici e talvolta è un utile fattore discriminante per la diagnosi differenziale tra patologie che presentano quadri clinici simili (Beguin, 2003).

I livelli di espressione del TfR risultano aumentati nelle cellule neoplastiche, rispetto alle loro normali controparti, probabilmente in quanto le cellule che si dividono rapidamente necessitano di maggiori quantità di ferro, quale cofattore dell'enzima ribonucleotide-riduttasi, coinvolto nella sintesi del DNA (Daniels et al., 2006). Nelle cellule degli epiteli mammari con tumori

maligni, l'espressione del TfR può essere fino a 4-5 volte superiore rispetto alle cellule mammarie non neoplastiche (Tonik et al., 1986; Walker & Day, 1986). Anche i carcinomi delle cellule di transizione della vescica, il cancro della mammella, i gliomi, l'adenocarcinoma del polmone, la leucemia linfoide cronica ed il linfoma non-Hodgkin hanno mostrato un aumento dell'espressione del TfR che risulta correlato al grado e allo stadio del tumore o alla prognosi (Habeshaw et al., 1983; Seymour et al., 1987; Das Gupta & Shah, 1990; Kondo et al., 1990; Prior et al., 1990; Yang et al., 2001). I tumori maligni primari della prostata con un'elevata espressione del TfR hanno maggiori probabilità di recidiva, rispetto a quelli con bassi livelli di TfR (Smith et al., 1990). Nei pazienti con linfomi, mielomi o leucemie, l'espressione del TfR nelle cellule mononucleate del sangue periferico è aumentata rispetto ai pazienti normali (Yeh et al., 1984). Questi dati suggeriscono che l'espressione del TfR è incrementata sulle cellule dei tumori circolanti, sulle cellule precursori dei tumori o sulle cellule che sono state attivate durante la cancerogenesi.

Il recettore della transferrina si è inoltre rivelato un prezioso biomarcatore del danno da irradiazione nell'uomo e nei ratti. Studi sperimentali in cui i ratti erano irradiati con diverse dosi di raggi X hanno evidenziato un incremento, prolungato nel tempo, della percentuale degli eritrociti circolanti che esprimono il recettore e la possibilità di definire una precisa relazione matematica tra la dose di radiazioni ricevuta e l'incremento registrato; la curva dose-risposta permette di risalire alle dosi di radiazioni a cui un individuo è stato esposto in

passato e consente di fare previsioni circa il residuo danno da irradiazione che si potrà misurare in futuro, il tutto con un semplice prelievo di sangue ed un'indagine immunocitochimica per l'identificazione e la stima della percentuale di eritrociti marcati con il recettore della transferrina (Gong et al., 1999).

## ***2.2 Il recettore 2 della transferrina***

Tra il 1998 ed il 1999, un secondo recettore della transferrina (TfR2) è stato identificato da due gruppi indipendenti: Glockner et al. (1998) hanno identificato il gene del TfR2 mentre clonavano l'intera regione del cromosoma umano 7q22; Kawabata et al. (1999) hanno identificato questa proteina mentre cercavano nuovi fattori di trascrizione associati allo sviluppo del cancro. Quest'ultimo gruppo successivamente ha identificato il TfR2 nei topi (Kawabata et al., 2001 *a*) ed anche caratterizzato il TfR2 umano (Kawabata et al., 2000; Kawabata et al., 2001 *b*). Contrariamente al TfR1, l'espressione del TfR2 non è regolata in risposta ai livelli intracellulari di ferro (Kawabata et al., 2000; Kawabata et al., 2001 *b*).

Il pattern dell'espressione del TfR2 sembra differente da quello del TfR1 (Trinder & Baker, 2003). L'espressione del TfR2 è stata descritta negli epatociti, negli enterociti dell'intestino tenue (Kawabata et al., 2001 *b*; Deaglio et al., 2002) e in varie linee cellulari umane derivate da tumori solidi e linee cellulari selezionate B e mieloidi (Deaglio et al., 2002). Nelle linee cellulari HepG2, di epatoma umano, K562 e HEL-R, eritroleucemiche umane (Kawabata et al., 1999; Kawabata et al., 2001 *a*) sono state trovate elevate quantità dell'mRNA del TfR2, mentre le linee cellulari linfoidee umane Raji e MOLT-16 e le linee cellulari mieloidi umane U937, NB4, HL-60, KCL22 e KG-1 esprimono livelli bassi o non rilevabili di mRNA del TfR2 (Kawabata et al., 2001 *b*). L'mRNA del TfR2 è stato anche rilevato nei precursori eritroidi umani CD34<sup>+</sup>, isolati dal

normale sangue periferico. Anche per il TfR2 sono state osservate delle associazioni tra i livelli di espressione della glicoproteina e la prognosi: i casi di leucemia mieloide e non eritroide hanno livelli significativamente elevati di TfR2 confrontati con cellule non maligne del midollo osseo e che questa regolazione a monte contribuisce ad una prognosi migliore (Kawabata et al., 2001 *b*; Nakamaki et al., 2004). Quindi, il TfR2 potrebbe essere un nuovo fattore prognostico per pazienti con leucemia mieloide acuta (Kawabata et al., 2001 *b*).



### ***2.3 Il recettore della transferrina e il danno da irradiazione nel ratto***

I precursori dei globuli rossi nel midollo osseo e gli stessi eritrociti nel sangue circolante dei ratti possono essere indicatori del danno da irradiazione (Gong et al., 1999). A questa scoperta si è pervenuti attraverso una ricerca, il cui obiettivo iniziale era lo studio della normoblastosi midollare prolungata, che si induce nei ratti ai quali sono somministrate dosi di raggi X che vanno da 0,1 a 150 cGy. Solo in seguito è stata descritta la presenza, nel sangue circolante, di eritrociti maturi che esprimono il TfR in superficie. Si è visto, infatti, che i ratti sottoposti ad irradiazione X mostrano:

- a livello midollare, un significativo incremento della percentuale di normoblasti, i precursori dei globuli rossi, che si riscontra per diverse settimane dopo il trattamento;
- nel sangue circolante, una sottopopolazione di eritrociti marcati con il recettore della transferrina (TfR).

Queste due progenie della cellula staminale emopoietica sono accomunate da due interessanti caratteristiche:

1. una curva dose-risposta, che descrive il fenomeno in un intervallo particolarmente ampio, da 0,1 a 600 cGy, ed è composta da due parti, logaritmica la prima e quadratica la seconda, che si uniscono approssimativamente al punto corrispondente a 150 cGy;

2. un'uguale durata del periodo richiesto per la riparazione della metà del danno cellulare stimato ( $T-1/2$ ), pari a 29 settimane (Gong et al., 1999).

## ***2.4 Il recettore della transferrina e il danno da irradiazione nell'uomo***

Sono stati analizzati anche dei campioni di sangue prelevati da soggetti normali e da pazienti con tumori solidi che erano stati sottoposti da 3-6 settimane a radioterapia, allo scopo di stabilire il numero di eritrociti che esprimevano il TfR. I pazienti erano stati sottoposti a  $\gamma$ -irradiazione parziale; le dosi totali sono state normalizzate per ottenere l'equivalenza all'irradiazione totale: per esempio, se la zona trattata conteneva il 10% del midollo emopoietico dell'intero organismo e la dose totale era di 5300 cGy, si è stimata la dose di 530 cGy (10% di 5300 cGy) come dose equivalente per tutto il midollo. I valori di controllo sono stati determinati mediante analisi del sangue di 5 maschi in salute, di età compresa tra i 27 e i 54 anni, che erano stati esposti solo occasionalmente a raggi X per esami diagnostici di routine, come le radiografie.

Sia la sensibilità all'irradiazione nell'intervallo di dose, sia l'entità della risposta dei soggetti umani sono risultate simili a quelle del modello animale (Gong et al., 1999).

## ***2.5 Implicazioni dei risultati ottenuti***

I risultati suggeriscono decisamente che la velocità di recupero delle cellule staminali emopoietiche non è dose-dipendente. Inoltre, la sovrapponibilità dei T-1/2 per gli eritrociti marcati con il TfR ed i RBCp è a sostegno del fatto che entrambi riflettono le dinamiche delle cellule staminali emopoietiche. Sebbene questo studio preliminare dei pazienti umani sia piuttosto precoce a 3-6 settimane dal trattamento con raggi  $\gamma$ , i valori delle percentuali di RBC marcati con TfR hanno mostrato un ampio intervallo di coefficienti che vanno dal 2,8% per 1,3 cGy a 12,6% per 530 cGy.

Il T-1/2 per la diminuzione degli eritrociti che esprimono il TfR nei soggetti umani non è stato ancora studiato. È possibile che con misurazioni aggiuntive si possano osservare valori del 20% per i RBC marcati con TfR. Si potrebbe considerare di sostegno al modello logaritmico-quadratico proposto la compatibilità apparente di alcuni dati, riguardanti la relazione tra dose e risposta, nei topi e nell'uomo (Akiyama et al., 1992; Schiestl et al., 1994).

La persistenza del danno alla cellula staminale emopoietica nei soggetti umani è stata riportata da Kyoizumi et al. (1996). Misurazioni ripetute della frequenza di mutanti emizigoti per la glicoforina A (GPA) in dieci sopravvissuti alla bomba atomica di Hiroshima sono state trovate decisamente elevate e ripetibili nel periodo 1988-1993, 40 anni dopo l'irradiazione, una persistenza per un tempo pari ad almeno il 40% della vita di un individuo.

Più recentemente, si è visto che i sopravvissuti alla bomba atomica mostrano un diminuito rischio relativo di leucemia mieloide acuta e cronica, quindi una riparazione spontanea della cellula staminale emopoietica è possibile (Little et al., 1999).

## **2.6 La glicoforina A**

Gli eritrociti umani presentano 4 diverse glicoforine: A, B, C, D (Lisowska, 2001); le glicoforine sono le principali sialoglicoproteine degli eritrociti umani e animali, sono glicoproteine transmembrana che giocano un ruolo fondamentale nell'interazione tra gli eritrociti e tra questi e l'endotelio vascolare. La glicoforina più abbondante è quella di tipo A (de Isla et al., 2003).

Insieme alla proteina della Banda 3, la glicoforina A (GPA), costituisce la più abbondante proteina integrale della membrana eritrocitaria (Young et al., 2000). La GPA umana è il prodotto genico di due alleli espressi in codominanza, che definiscono i tipi M ed N del gruppo sanguigno MN. La sua principale funzione è quella di migliorare il ripiegamento e la maturazione della Banda 3; inoltre, nell'arco di un limitato intervallo di tempo, durante la maturazione eritroide, essa coadiuva l'incorporamento di grandi quantità di Banda 3 correttamente ripiegata nella membrana (Young et al., 2000).

Le glicoproteine di membrana sono i principali recettori attraverso i quali gli agenti patogeni infettano le cellule: ad esempio, il *Plasmodium falciparum*, agente eziologico della malaria, invade gli eritrociti utilizzando proprio la GPA come recettore. È stato ipotizzato che, nei Mammiferi, le glicoproteine di membrana degli eritrociti potrebbero agire da recettori "esca", in modo tale da attrarre i patogeni verso gli eritrociti, elementi figurati maturi e privi di nucleo, impedendogli così di raggiungere le normali cellule bersaglio (Gagneux & Varki, 1999). *In vitro*, la GPA lega molti batteri e virus, che non infettano gli

eritrociti, verosimilmente in accordo con l'ipotesi dei recettori "esca". Da uno studio sulla variazione della sequenza della GPA in sei primati e in una popolazione umana (Baum et al., 2002), è risultato un grande eccesso di sostituzioni non sinonime – ossia, sostituzioni di una tripletta con un'altra che codifica per un aminoacido differente - in ciascun gruppo di primati ed un significativo eccesso di polimorfismo nell'esone 2 nell'uomo. Tali osservazioni indicano una forte selezione positiva su questo recettore, con la divergenza della GPA durante l'evoluzione dei primati, ed una selezione bilanciata, che ha mantenuto un forte polimorfismo nella GPA umana.

## ***2.7 La glicoforina A quale biomarker del danno da irradiazione nell'uomo***

La glicoforina A si è rivelata un utile *biomarker* per la valutazione del danno da esposizione ad agenti mutageni, in quanto rileva le mutazioni che possono accumularsi principalmente nelle cellule staminali del midollo osseo (Akiyama et al., 1996). Studi in merito sono stati condotti sui superstiti delle bombe atomiche di Hiroshima e Nagasaki: le ben note dosi di esposizione e relazioni tra le dosi di ricevute e il rischio di sviluppare il cancro, rendono tale popolazione particolarmente adatta allo studio dei rapporti intercorrenti tra la mutazione somatica e il rischio di cancro (Akiyama et al., 1996). L'analisi dei superstiti eterozigoti delle bombe atomiche di Nagasaki e di Hiroshima, ha consentito di osservare mutanti emizigoti per la GPA (Mf) negli eritrociti umani, attraverso due studi, compiuti complessivamente tra il 1988 ed il 2000 su un totale di 3.100 superstiti eterozigoti MN (Kyoizumi et al., 1987; Kyoizumi et al., 2005), nei quali sono stati esaminati la relazione tra la dose di radiazione ricevuta e l'emizigosi per la GPA Mf ed il rapporto fra GPA Mf e rischio di cancro. I superstiti studiati vivevano a diversi chilometri rispettivamente da Hiroshima e Nagasaki, consentendo così di stabilire la dose minima di radiazioni assorbite in grado di indurre l'insorgenza del cancro. L'analisi citofluorimetrica ha portato all'identificazione di quattro tipi di cellule mutanti: quelle che perdono la forma M di GPA (emizigoti MØ), quelle che perdono la forma N



(emizigoti NØ), quelle che perdono l'espressione di uno dei due alleli con raddoppiamento dell'altro (omozigoti NN e MM).

Le analisi dose-risposta della GPA Mf, a confronto fra gruppi che hanno sviluppato il cancro e gruppi che non lo hanno sviluppato, sono state effettuate tenendo in considerazione anche fattori quali l'età, il sesso, la città di appartenenza e lo stile di vita. È stata trovata una relazione logaritmica tra la frazione mutante emizigote di GPA e la dose di radiazione assorbita, espressa in Sieverts (Sv). Il valore soglia necessario per avere la frazione GPA mutata, pari a 0.24 Sv, comporta un basso rischio di cancro, mentre una dose pari almeno a 1.20 Sv comporta un alto rischio di cancro. È interessante notare che, mentre la GPA Mf era significativamente più alta nei soggetti che hanno sviluppato il cancro rispetto a quelli cancro-privi, nei controlli delle due città non esposti all'irradiazione non è stata riscontrata una differenza significativa di GPA Mf fra gruppi cancerogenici e gruppi cancro-privi. Tali risultati conducono all'ipotesi di una precoce insorgenza del cancro, dovuta all'aumento di mutazioni oppure ad una maggiore sensibilità alle radiazioni nei soggetti che hanno sviluppato il cancro. Peraltro, è stato osservato che i soggetti di Hiroshima sono più suscettibili al cancro rispetto a quelli di Nagasaki, fenomeno probabilmente spiegabile, almeno in parte, con la diversa origine etnica ed il differente stile di vita degli abitanti delle due città in esame (Kyoizumi et al., 1987; Kyoizumi et al., 2005).

## ***Capitolo 3***

### ***LE TORPEDINI E IL DANNO DA IRRADIAZIONE***

#### ***3.1 Le torpedini***

Tra i possibili modelli sperimentali da impiegare nell'ambito del progetto di ricerca, sono state scelte le torpedini (*Torpedo marmorata* Risso e *Torpedo ocellata* Rafinesque), Pesci Cartilaginei diffusi nel Mar Mediterraneo e nell'Oceano Atlantico Orientale. Le torpedini si nutrono di piccoli pesci e crostacei, che stordiscono e catturano con scosse elettriche: sono, infatti, dotate di un organo elettrogeno, la cui scarica, di voltaggio variabile tra 8 e 220 V, viene utilizzata anche per allontanare i predatori. In condizioni naturali, pur essendo delle ottime nuotatrici, le torpedini trascorrono gran parte del loro tempo senza compiere lunghi spostamenti, ma restando immobili sui fondali sabbiosi e melmosi, dove, grazie alla loro forma piatta e alla colorazione grigio-marrone, si mimetizzano e risultano invisibili alle prede. Un simile stile di vita, prevalentemente bentonico, rende auspicabile il loro impiego quali bioindicatori di inquinamento da radiazioni, data la caratteristica stanzialità. Inoltre, poiché le torpedini hanno mostrato un'elevata radio-resistenza (Pica et al., 2000), si prevede che gli esperimenti non causeranno la perdita di vite animali.

### ***3.2 Le cellule eritroidi del sangue circolante delle torpedini***

Le cellule del sangue delle torpedini sono state studiate e caratterizzate dal punto di vista morfologico (Pica et al., 1983) e citochimico (Grimaldi et al., 1983). L'eritropoiesi nelle torpedini si completa nel sangue circolante ove si riscontrano tutti gli stadi maturativi eritroidi (figura 1). Gli eritrociti maturi sono le cellule più abbondanti; gli eritroblasti acidofili e quelli basofili sono presenti in percentuali molto variabili da un soggetto all'altro (Pica et al., 1983),  $17,5\% \pm 3,9\%$  per gli acidofili e  $1,7\% \pm 0,5\%$  per i basofili nei soggetti giovani. Tali percentuali dipendono da molteplici fattori, quali l'età dell'animale, la sua attività emopoietica e il periodo stagionale, del quale risentono tutti i Vertebrati ectotermi (Glomski & Pica, 2004).

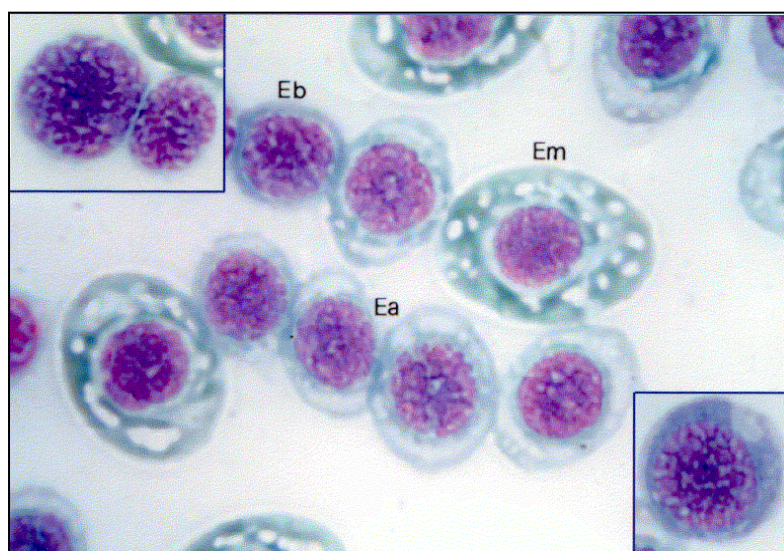


Figura 1. Striscio di sangue periferico di torpedine. Si riconoscono i diversi stadi della maturazione eritroide. Ingr. Tot. 800x.

Gli eritrociti maturi hanno forma ellissoidale e dimensioni medie di 33 x 24  $\mu\text{m}$ , i nuclei sono allungati, con diametro medio di 12 x 8,5  $\mu\text{m}$ , e la distanza tra l'involucro nucleare e il margine della cellula all'equatore mediamente misura 8  $\mu\text{m}$ . Nella maggior parte delle cellule eritroidi si notano a livello citoplasmatico diversi vacuoli, il cui diametro oscilla tra 0,5 e 2,0  $\mu\text{m}$ . Il citoplasma mostra un'intensa positività alla reazione alla benzidina-perossidasi, nota come reazione di Lepehne, colorandosi in giallo-verde. Con la colorazione panottica di May Grünwald Giemsa, il citoplasma assume una tinta rosa chiara, mentre i vacuoli rimangono incolori.

A livello ultrastrutturale, il citoplasma sembra essere costituito da una matrice elettrondensa, uniformemente distribuita. I vacuoli sono generalmente elettrone-trasparenti e talvolta contengono una fine sostanza granulare e sono racchiusi in una membrana dello spessore di 90-100 Å. Nella matrice si distinguono pochi ribosomi liberi ed alcune microvescicole. Nel nucleo si osservano masse dense di eterocromatina, spesso condensate in prossimità dell'involucro nucleare.

In ogni striscio di sangue, accanto agli eritrociti maturi, si possono osservare altre cellule eritroidi più piccole, di forma allungata, a cui gli Autori hanno dato il nome di eritroblasti acidofili: essi misurano 18-25 x 10-16  $\mu\text{m}$ , sono positivi alla reazione di Lepehne e mostrano le medesime affinità tintoriali delle cellule mature, dalle quali differiscono però per il frequente riscontro di nuclei in mitosi. L'aspetto ultrastrutturale del citoplasma è caratterizzato dalla

presenza di ribosomi liberi con profili di reticolo endoplasmatico rugoso, microvescicole e vacuoli meno grandi e numerosi. Nel nucleo, la cromatina appare più finemente dispersa ed è in genere distinguibile il nucleolo.

Risulta semplice distinguere gli eritroblasti basofili dalle altre cellule già descritte, innanzitutto per la forma rotondeggiante, quindi per le dimensioni, che in genere non superano i 16  $\mu\text{m}$ , e infine per il citoplasma, che assume un'intensa tonalità blu se colorato con il metodo panottico di May Grünwald Giemsa o una serie di sfumature, dal grigio intenso al verde, con la reazione di Lepehne. Nel nucleo, la cromatina ha l'aspetto di una rete a maglie strette, con pochi cromocentri. Al microscopio elettronico la cromatina nucleare appare mediamente elettrondensa, il nucleolo è evidente e nel citoplasma si distinguono numerosi ribosomi con diverse microvescicole e piccoli vacuoli.

### ***3.3 Cenni sull'eritropoiesi delle torpedini***

Nel lungo percorso evolutivo dei Vertebrati, dai Pesci ai Mammiferi, si assiste ad una variazione della localizzazione e della struttura dei centri emopoietici. In particolare il midollo osseo, che costituisce l'unico organo emopoietico nel Mammifero adulto, diventa sede emopoietica solo a partire dagli Anfibi, nei quali per giunta la sua attività è transitoria, ed in seguito nei Rettili e negli Uccelli, accanto ad altri organi emopoietici (Pica et al., 1991).

I Pesci Cartilaginei, quali le torpedini, sono privi di midollo osseo e l'emopoiesi ha luogo in diversi siti: nel tessuto linfomieloide, formato da vari centri distribuiti lungo il tubo digerente o in sede perigonadica, nella milza e, in alcuni casi, nella regione sottocapsulare del fegato (Pica & Della Corte, 1987). Nel tessuto linfomieloide si svolge principalmente la granulocitopoiesi e solo in minima parte la linfocitopoiesi, che è localizzata essenzialmente a livello splenico. La milza è inoltre sede della trombocitopoiesi, dell'eritropoiesi e probabilmente della monocitopoiesi (Pica & Della Corte, 1987).

L'eritropoiesi si svolge nella polpa rossa della milza e si completa nel sangue circolante, attraverso vari stadi maturativi a partire dai proeritroblasti, agli eritroblasti basofili, fino agli eritroblasti acidofili e quindi agli eritrociti maturi.

I proeritroblasti hanno un diametro medio di circa 20  $\mu\text{m}$ , un nucleo grande in cui in genere è visibile un nucleolo, ed un citoplasma nettamente basofilo, tipiche caratteristiche delle cellule immature.

Gli eritroblasti basofili sono più piccoli, la cromatina nucleare ha un aspetto a zolle ed il citoplasma è meno intensamente basofilo, debolmente positivo alla reazione alla benzidina-perossidasi, segno di un'iniziale attività di sintesi dell'emoglobina. Tra questi si possono distinguere due stadi maturativi, corrispondenti all'eritroblasto I, di maggiori dimensioni e con indice mitotico più elevato, e all'eritroblasto II, che dopo un evento di divisione mitotica diventa eritroblasto acidofilo, tende ad assumere una forma ellissoidale che dalle dimensioni di 18x14  $\mu\text{m}$  raggiunge poi i 33x24  $\mu\text{m}$  dell'eritrocito maturo (Della Corte & D'Ippolito, 1999).

### ***3.4 Il danno da irradiazione negli Elasmobranchi***

Uno studio sulla capacità di sopravvivenza e di recupero delle cellule del sangue periferico e degli organi emopoietici in seguito all'irradiazione X in *Torpedo marmorata* Risso (Pica et al., 2000), ha evidenziato che solo un'alta dose di raggi X, pari a 90 Gy, è in grado di produrre la completa distruzione dei tessuti emopoietici senza immediati effetti letali. Ciò costituisce un fatto sorprendente se si pensa che, negli Elasmobranchi, manca il midollo osseo e gli organi emopoietici non sono protetti da un tessuto duro che funga da barriera più o meno efficiente contro le radiazioni. Nell'uomo, dosi di 5 Gy producono gravi danni all'emopoiesi e deplezione di tutti gli elementi figurati del sangue mentre dosi di 50 Gy sono letali nei topi. L'autotrapianto di cellule ematiche in torpedini così irradiate rigenera il tessuto emopoietico consentendo all'animale di ripristinare i normali valori ematologici (Pica et al., 2000).

Gli effetti dell'irradiazione X sugli organi emopoietici – in particolare, il timo - dei Pesci Cartilaginei sono stati valutati anche in uno studio sulla razza *Raja eglanteria* (Wyffels et al., 2005). Gli esemplari sono stati irradiati con dosi da 0 a 75 Gy per valutare l'area del timo e il suo aspetto istologico a 12 giorni dall'irradiazione. L'area del timo risultava ridotta, in funzione della dose ricevuta, con una relazione di tipo logaritmico, e le cisti midollari osservate dagli Autori, simili ai corpuscoli di Hassall, aumentavano con la dose di radiazione ricevuta. La capacità di recupero del danno timico è stata valutata a seguito di irradiazione con dosi fino a 18 Gy, in un periodo di osservazione di 40



giorni, al termine del quale non è stato osservato un recupero completo, ma un ripopolamento con pro-timociti ed un parziale ripristino della normale architettura del timo. La risposta all'irradiazione, in termini di radio-sensibilità, dei timociti della razza è paragonabile a quella degli altri Vertebrati, anche se è stato osservato un tempo di recupero più prolungato.

## ***Capitolo 4***

### ***MATERIALI E METODI***

#### ***4.1 Articolazione del lavoro sperimentale***

Il presente studio si propone di caratterizzare l'espressione del TfR e della GPA utilizzando diversi approcci sperimentali: l'indagine si avvale di tecniche immunocitochimiche, applicate nel campo della citofluorimetria, della microscopia ottica, convenzionale e a fluorescenza, e della microscopia elettronica. È stata valutata l'espressione delle due glicoproteine in esame prima dell'esposizione ai raggi X e dopo irradiazione, in dosi differenti. I prelievi di sangue venoso (circa 0,5 mL di sangue, reso incoagulabile con EDTA) sono stati effettuati ad intervalli regolari di tempo, onde monitorare la risposta degli animali: il primo prelievo al tempo zero, ossia prima del trattamento; i successivi erano ripetuti con cadenza settimanale per un periodo di osservazione di 1 mese. Ad ogni prelievo, per tutti gli esemplari, è stata realizzata l'immunomarcatura per l'analisi citofluorimetrica e sono stati allestiti degli strisci di sangue per l'osservazione morfologica e le reazioni immunocitochimiche. Inoltre, dai preparati analizzati al citofluorimetro, sono stati ottenuti degli strisci per l'osservazione al microscopio ottico a fluorescenza. Infine, per alcuni esemplari sono stati allestiti dei campioni da utilizzare,

insieme a quelli risalenti ad esperimenti precedenti, per lo studio morfologico e immunocitochimico a livello ultrastrutturale.

## ***4.2 Esempolari utilizzati nel progetto di ricerca***

Gli animali sono stati pescati e stabulati presso la Stazione Zoologica di Napoli “Anton Dohrn”, in grandi vasche, con elevati standard igienici, mantenuti con l’impiego di specifici filtri ed ossigenatori; sono stati nutriti regolarmente con le loro prede naturali; inoltre, in occasione dei prelievi dei campioni di sangue, le aree di interesse sono state delicatamente disinfettate ed in generale, nelle fasi di trasporto e al momento dei trattamenti, gli animali sono sempre stati trattati con la massima cura onde minimizzare lo stress, il dolore e la sofferenza, in linea con il concetto di “benessere animale” applicato alle condizioni sperimentali.

La prima fase del progetto di ricerca è stata dedicata esclusivamente alla rivelazione del TfR. Con il procedere delle osservazioni sul TfR si è poi ritenuto opportuno ampliare tale studio anche alla rivelazione della glicoforina A, pertanto sugli ultimi esemplari sono stati valutate contemporaneamente le due molecole di interesse.

Complessivamente, sono state impiegate nello studio 19 torpedini adulte, di peso compreso fra 150 e 600 g circa, appartenenti alle specie *Torpedo marmorata* Risso (3 esemplari ♀♀) e *Torpedo ocellata* Rafinesque (16, di cui 10 ♂♂ e 6 ♀♀). Gli esemplari sono stati denominati con una sigla alfanumerica, che indica la specie di appartenenza ed il numero identificativo (Tm1: *Torpedo marmorata*, esemplare n°1; To2: *Torpedo ocellata*, esemplare n°2).

Ad ogni prelievo, per tutti gli esemplari, veniva eseguita l'immunomarcatura per la citofluorimetria, con relativa osservazione al microscopio a fluorescenza, oltre all'esame emocromocitometrico e l'osservazione delle cellule del sangue in microscopia ottica convenzionale. Il TfR è stato valutato in citofluorimetria in tutti gli esemplari utilizzati, la GPA in 5 esemplari (To17, To18, To19, To20 e To21). L'indagine immunocitochimica in microscopia ottica è stata effettuata in un campione rappresentativo delle varie dosi di irradiazione in 5 torpedini per il TfR e 7 per la GPA. Inoltre, poiché i dati ottenuti dimostravano una maggiore risposta negli esemplari irradiati con dosi più elevate, da questi ultimi sono stati allestiti dei campioni per lo studio immunocitochimico ultrastrutturale al microscopio elettronico a trasmissione (TEM), valutati insieme ad altri campioni, derivanti da esperimenti precedenti, già fissati ed inclusi in resina epossidica, di 3 torpedini della specie *Torpedo marmorata*, irradiate a 70, 80 e 90 Gy.

Nella pagina seguente sono riportati i nomi degli esemplari studiati, le loro caratteristiche, sesso e peso, e le dosi di radiazioni ricevute, stabilite in funzione del peso corporeo.

<b>Esemplare</b>	<b>Sesso</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Dose (Gy)</b>
<b>Tm1</b>	♀	400	45
<b>To2</b>	♂	300	45
<b>Tm3</b>	♀	400	90
<b>To4</b>	♀	400	90
<b>To5</b>	♀	600	90
<b>To6</b>	♂	300	45
<b>Tm8</b>	♀	300	45
<b>To9</b>	♀	500	90
<b>To10</b>	♀	150	20
<b>To11</b>	♀	500	90
<b>To12</b>	♀	100	20
<b>To13</b>	♂	400	45
<b>To14</b>	♂	300	45
<b>To16</b>	♂	600	90
<b>To17</b>	♂	600	40
<b>To18</b>	♂	200	10
<b>To19</b>	♂	200	10
<b>To20</b>	♂	500	10
<b>To21</b>	♂	300	10

**Tabella 1.** Caratteristiche fisiche degli esemplari utilizzati e dosi di radiazioni X ricevute.

### ***4.3 Irradiazione***

L'irradiazione è stata effettuata con un acceleratore lineare a 6 mV (Siemens), in uso per la radioterapia per pazienti oncologici presso l'Istituto di Scienze Radiologiche della Facoltà di Medicina della Seconda Università di Napoli, con l'adozione di tutte le misure necessarie per minimizzare lo stress degli animali. In base ai risultati ottenuti, in precedenza, dal gruppo di ricerca (Pica et al., 2000), gli animali sono stati irradiati total body con dosi rispettivamente crescenti di raggi X (10, 20, 40, 45 o 90 Gy).

#### ***4.4 Citometria a flusso***

Inizialmente lo studio dell'espressione del TfR e della GPA con la citometria a flusso è stato condotto con un metodo che consente la sola analisi dell'espressione superficiale dell'antigene. Successivamente, con l'osservazione dei risultati delle prime reazioni immunocitochimiche al microscopio ottico, che evidenziavano un'internalizzazione dei *markers* di interesse nelle cellule eritroidi, si è optato per una tecnica di marcatura cellulare che consente di rivelare la presenza dei *markers* anche a livello citoplasmatico.

Con il primo metodo, le cellule eritroidi, ottenute per centrifugazione del sangue diluito 1:1 con PBS, sono state incubate per 20 minuti a temperatura ambiente con l'anticorpo monoclonale anti-TfR FITC (anti-CD71 FITC, Becton, Dickinson & Co., USA) o monoclonale anti-GPA PE (anti-GPA PE, Becton, Dickinson & Co., USA) in rapporto 2:1, e successivamente lavate in PBS, centrifugate e nuovamente sospese in PBS.

Il secondo metodo è basato sulla doppia incubazione con l'anticorpo specifico e l'impiego del kit Fix & Perm (Caltag Laboratories, An Der Grub Bio Research GmbH, Austria), con l'utilizzo di un fissativo aldeidico, che agisce dopo la prima incubazione delle cellule, non ancora permeabilizzate, con l'anticorpo, e di detergenti che permeabilizzano le cellule e consentono il legame dell'anticorpo all'antigene espresso nel citoplasma, durante la seconda incubazione. Le cellule eritroidi, ottenute per centrifugazione del sangue diluito 1:1 con PBS, sono state incubate per 15 minuti a temperatura ambiente con gli



stessi anticorpi utilizzati in precedenza; quindi sono state fissate e poi lavate e centrifugate in PBS, onde eliminare l'eccesso di fissativo. A questo punto sono state incubate per 20 minuti a temperatura ambiente con gli agenti permeabilizzanti e l'anticorpo specifico, contemporaneamente; quindi lavate in PBS, centrifugate e nuovamente sospese in PBS.

L'analisi al citofluorimetro è stata condotta in collaborazione con il dott. Giuseppe Pirozzi del Laboratorio di Diagnostica molecolare, analisi di immagine e citofluorimetria presso il Dipartimento di Oncologia Sperimentale dell'Istituto Nazionale Tumori, Fondazione G. Pascale, con un citofluorimetro FACS Vantage (Becton Dickinson) in cui la sorgente di radiazione, di lunghezza d'onda pari a 488 nm, è un laser Enterprise.

#### ***4.5 Microscopia ottica a fluorescenza***

Dalle sospensioni cellulari, analizzate al citofluorimetro, dopo la centrifugazione, sono stati preparati degli strisci da osservare al microscopio ottico a fluorescenza, collegato all'analizzatore d'immagine Kontron Elektronik Imaging Computer System KS 300. Le immagini sono state acquisite con la camera Optronics Engineering DEI-750.

## ***4.6 Microscopia ottica***

Per l'osservazione morfologica delle cellule circolanti, gli strisci di sangue sono stati fissati e colorati con il metodo panottico di May Grünwald Giemsa; per le reazioni immunocitochimiche, sono stati fissati con metanolo.

### ***4.6.1 May Grünwald Giemsa***

Gli strisci di sangue, asciugati all'aria, sono stati ricoperti con il Reattivo May Grünwald, una soluzione di eosinato di blu di metilene in alcol metilico. Dopo una prima fase di 3 minuti, in cui ha agito da fissativo, per la presenza del metanolo, il reattivo è stato diluito 1:1 con H<sub>2</sub>O distillata e lasciato agire per successivi 5 minuti, come colorante. La diluizione scinde il legame tra l'eosina ed il blu di metilene, in modo che i coloranti possano interagire con le strutture cellulari e colorare quelle acidofile o eosinofile in rosa e quelle basofile in grigio-celeste; in genere, questa colorazione risulta insufficiente, in particolar modo per i granulociti. Successivamente, allontanato il May Grünwald, gli strisci sono stati ricoperti per 20 minuti con una soluzione acquosa del Reattivo Giemsa, preparata con 2 gocce di colorante per mL di H<sub>2</sub>O distillata. Il colorante Giemsa è una soluzione acquosa satura di azzurro II-eosina e blu di metilene, che colora tutte le componenti cellulari, acidofile e basofile, in particolare l'azzurro II colora più intensamente i nuclei dei granulociti in genere ed i granuli dei basofili. Dopo la colorazione, gli strisci sono stati lavati prima in H<sub>2</sub>O di fonte e poi in H<sub>2</sub>O distillata, infine asciugati all'aria ed osservati al microscopio.

Il metodo appena descritto consente di distinguere chiaramente tutte le cellule del sangue e le loro strutture principali (Della Corte & D'Ippolito, 1999): i nuclei si colorano in violetto; il citoplasma acidofilo in rosa, quello basofilo in blu più o meno scuro, quello policromato filo in grigio; le granulazioni acidofile o eosinofile assumono tinte dal rosso al rosa-arancio, quelle basofile si colorano in viola scuro per metacromasia, quelle neutrofile in grigio-rosa ed infine le granulazioni azzurrofile sono blu scuro o violette.

Gli strisci di sangue colorati con May Grünwald Giemsa sono stati utilizzati per l'osservazione della morfologia cellulare, indispensabile in qualunque studio ematologico, e per la determinazione delle formule eritroblastiche, ossia dell'abbondanza relativa, in termini percentuali, dei vari stadi maturativi eritroidi rispetto al totale delle cellule eritroidi circolanti, ossia eritroblasti basofili, eritroblasti acidofili ed eritrociti.

#### ***4.6.2 Fissazione con metanolo***

Gli strisci di sangue da utilizzare per le reazioni immunocitochimiche sono stati completamente immersi in alcol metilico alla temperatura di 4°C, per 3 minuti, e poi asciugati all'aria.

#### ***4.6.3 Reazioni immunocitochimiche***

Sono stati utilizzati gli strisci di sangue appartenenti ad un campione rappresentativo di esemplari, per lo studio del TfR e della GPA. Il TfR è stato

studiato in Tm1 (45 Gy), Tm3 (90 Gy), To4 (90 Gy), To5 (90 Gy) e To6 (45 Gy), la GPA in To4, To5, To6, To17 (40 Gy), To18 (10 Gy), To19 (10 Gy) e To20 (10 Gy). Gli strisci di sangue sono stati preventivamente sottoposti a smascheramento antigenico in tampone citrato (18 mL di citrato di sodio diidrato 3,2% e 82 mL di acido citrico 2,1%). Per i cicli di riscaldamento è stato utilizzato il forno a microonde (R208 Sharp, Amburgo, Germania), alla potenza di 240 W. Poiché il sistema di rivelazione impiegato in questa metodica si basa sulla formazione di un prodotto colorato per azione di perossidasi esogene, è stato necessario inibire quelle endogene incubando gli strisci con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% per 15 minuti. Successivamente, gli strisci sono stati lavati in PBS (tampone fosfato 0,1 M a pH 7,4) ed incubati per 1 h con la soluzione *blocking* (bloccante), preparata con 320 µL di siero di capra (Normal Goat Serum, Dako, Glostrup, Danimarca), 6,4 mL di PBS e 1,4 µL di una soluzione allo 0,3% di Triton X-100. Il siero di capra si lega ai siti che formano legami aspecifici, saturandoli ed evitando il legame aspecifico dell'anticorpo, a garanzia della specificità della reazione. Il Triton X-100 è un detergente e la sua azione consiste nel permeabilizzare le membrane, onde consentire l'ingresso degli anticorpi e del sistema di rivelazione nel citoplasma. Gli strisci sono stati quindi incubati *over night* a 4°C con l'anticorpo primario: per il TfR, è stato usato un anticorpo policlonale (CD71 Rabbit Polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, California, USA), diluito 1:1 con la soluzione *blocking*; per la GPA, un

anticorpo policlonale (GPA Rabbit Polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, California, USA), diluito con *blocking* 1:10.

Dopo l'incubazione, gli strisci sono stati lavati in PBS ed in seguito incubati per 2 h con l'anticorpo secondario Goat Anti Rabbit biotinilato (Biotinylated Anti Rabbit IgG made in Goat, Vector Laboratories, Burlingame, California, USA), diluito 1:1 nel caso del TfR e 1:10 per la GPA. Gli strisci sono stati nuovamente lavati in PBS ed incubati per 60 minuti con la soluzione avidina-biotina perossidasi del kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA). Dopo vari lavaggi in PBS e Tris-HCl 0,1 M a pH 7.60, lo sviluppo della reazione è stato eseguito in 3,3'-diaminobenzidina (3,3'-DAB) allo 0,001% in Tris-HCl e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%. Successivamente, gli strisci sono stati lavati prima in Tris-HCl, poi in H<sub>2</sub>O distillata, quindi contrastati con emallume di Mayer per 30 secondi e lavati in H<sub>2</sub>O distillata, prima del viraggio in H<sub>2</sub>O di fonte. Infine sono stati asciugati all'aria e montati in balsamo sintetico Eukitt.

Gli strisci sono stati osservati al microscopio ottico, collegato all'analizzatore d'immagine Kontron Elektronik Imaging Computer System KS 300 e le immagini sono state acquisite con la Kontron Elektronik Progress 3008 Camera, in uso al Dipartimento delle Scienze Biologiche, Sezione di Biologia Evolutiva e Comparata, fino all'estate 2009, e successivamente con microscopio Leits, collegato al sistema di analisi delle immagini Axion Vision.

## ***4.7 Microscopia elettronica***

### ***4.7.1 Fissazione e inclusione***

Le cellule eritroidi, separate dal sangue per centrifugazione, sono state fissate in glutaraldeide allo 0,1% e paraformaldeide al 2% in tampone sodio cacodilato 0,1 M, lavate e postfissate in tetraossido di osmio all'1% ( $\text{OsO}_4$ ) per 1 h e lavate in NaCl allo 0,5% per 5 min, per eliminare l'eccesso di osmio. La disidratazione è avvenuta attraverso vari passaggi in alcol etilico a concentrazione crescente (50%, 70%, 90%, 100% I, 100% II), ciascuno di 30 min, prima dell'inclusione in resina Epon 812. Per alcuni campioni è stata omessa la postfissazione, in osmio allo scopo di preservare l'immunogenicità. In seguito è stato eseguito un passaggio in ossido di propilene per 30 min e infine in una miscela di ossido di propilene e resina Epon 1:1 *over night*. Il giorno seguente i campioni sono stati immersi in resina pura per 8 h, dopo la polimerizzazione della stessa, ottenuta con la permanenza in stufa alla temperatura di 60°C per 36 h.

Le sezioni ultrafini, che sono state ricavate con l'ultramicrotomo Reichert, della Stazione Zoologica "A. Dohrn" di Napoli, sono state raccolte su griglie di nichel. Per l'osservazione è stato utilizzato il microscopio elettronico a trasmissione Leo 912/AB (ZEISS), in uso anch'esso presso la Stazione Zoologica di Napoli. Il taglio delle sezioni e l'osservazione al TEM sono stati condotti con la gentile collaborazione dei sigg. Gennaro e Franco Iamunno.

#### **4.7.2 Immunolettromicroscopia per il TfR**

È stata utilizzata la tecnica dell'*immunogold*. Lo smascheramento antigenico è stato effettuato in tampone citrato in forno a microonde a 80 W per un tempo totale di 10 minuti (cfr. par. 4.6.3). I retini postfissati in OsO<sub>4</sub> sono stati sottoposti a più cicli di smascheramento rispetto a quelli non trattati, poiché l'osmio riduce l'antigenicità del preparato, probabilmente reagendo con le proteine e provocandone la deaminazione ossidativa (Bonucci, 1981). Per limitare quest'effetto dannoso sulle proteine, si è fatto precedere il trattamento con osmio da una fissazione aldeidica del pezzo, impiegando in questo caso una miscela di aldeide formica e glutarica.

Allo scopo di ammorbidire l'Epon e favorire l'esposizione dell'antigene all'anticorpo, le sezioni sono state incubate in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% per 10 min (trattamento di *etching*). Dopo i lavaggi in H<sub>2</sub>O distillata e PBS, le sezioni sono state trattate per 30 minuti con una soluzione *blocking*, costituita da Albumina di Siero Bovino (BSA) all'1% e glicina allo 0,15% in PBS. La BSA satura i siti carichi e non lascia spazio per l'adsorbimento dell'anticorpo primario, evitando il legame non specifico dell'anticorpo a molecole diverse dall'antigene di interesse, che può derivare da interazioni idrofobiche o elettrostatiche tra l'anticorpo e i componenti del tessuto (Muzi e Bologna, 1999). La glicina elimina i precipitati formati dai fissativi aldeidici, paraformaldeide e glutaraldeide (Muzi e Bologna, 1999).

Le sezioni sono state incubate *over night* a 4°C con l'anticorpo policlonale anti-TfR (CD71 Rabbit Polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, California, USA) diluito 1:5 in una soluzione di BSA allo 0,1% in PBS. Le sezioni sono state ripetutamente lavate in PBS, per eliminare l'eccesso di anticorpo primario, e poi trattate con BSA all'1% in PBS per 15 minuti, BSA allo 0,1% in PBS per 5 min e incubati a temperatura ambiente per 2 h con l'anticorpo secondario, Goat Anti Rabbit coniugato con particelle di oro colloidale del diametro di 25 nm (Aurion, Olanda), diluito 1:10 nella stessa soluzione utilizzata per l'anticorpo primario. Successivamente, le sezioni sono state lavate in PBS e contrastate con acetato di uranile per 30 min e citrato di piombo per 45 secondi, infine osservate al microscopio elettronico a trasmissione.

#### ***4.7.3 Immunolettromicroscopia per la GPA***

Come per il TfR, è stata utilizzata la tecnica dell'*immunogold*. Il protocollo ottimale per la rivelazione immunocitochimica ultrastrutturale della GPA differisce, però, in alcuni punti da quello per il TfR. Per lo smascheramento antigenico, i cicli hanno avuto una durata totale massima di 5 minuti e sono stati condotti sempre con un'erogazione di potenza di 240 W. Dopo l'*etching* e i successivi lavaggi, le sezioni sono state incubate per 30 minuti con la soluzione *blocking*, costituita da BSA 0,1% e TBST, soluzione a pH 7,5, preparata con 2,92 g di NaCl e 1,21 g di tris in 500 mL di H<sub>2</sub>O distillata con l'aggiunta di Tween 20. Il Tween 20 consente di ottenere lavaggi più



efficaci, con conseguente ridotta colorazione di fondo aspecifica, e di permeabilizzare le membrane, onde consentire l'ingresso dell'anticorpo. Il passaggio successivo è costituito dall'incubazione a 4°C con anticorpo policlonale anti-GPA (GPA Rabbit Polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, California, USA), diluito 1:10 in *blocking*. Dopo i lavaggi in TBS e TBST, le sezioni sono state incubate per 2 ore con anticorpo secondario Goat Anti Rabbit (GAR), coniugato con particelle di oro colloidale del diametro di 25 nm (Aurion, Olanda), diluito 1:20 con *blocking*, quindi nuovamente lavate in TBS e H<sub>2</sub>O distillata. Le sezioni sono state infine contrastate con acetato di uranile per 10 minuti e citrato di piombo per 30 secondi.

## ***Capitolo 5***

### ***RISULTATI***

Per una maggiore chiarezza espositiva, di seguito sono riportati, separatamente per il recettore della transferrina e la glicoforina A, i risultati ottenuti con le tecniche precedentemente descritte.

#### ***5.1 Risultati per il recettore della transferrina (TfR)***

##### ***5.1.1 Citofluorimetria***

Come già detto, inizialmente (prima fase) lo studio dell'espressione del TfR nelle cellule eritroidi circolanti delle torpedini è stato focalizzato sulla rivelazione a livello di membrana nei primi 12 esemplari (Tm1, To2, Tm3, To4, To5, To6, Tm8, To9, To10, To11, To12 e To13). L'evidenza, ottenuta in parallelo dalle reazioni immunocitochimiche in microscopia ottica, dell'avvenuta internalizzazione del recettore a seguito di insulto da radiazioni, ha suggerito l'opportunità di modificare il protocollo di marcatura, per consentire la visualizzazione del recettore internalizzato (seconda fase: To14, To16, To17, To18, To19, To20, To21).

Nella prima fase, è emerso che i controlli mostravano solo una piccola percentuale di cellule eritroidi che esprimevano il TfR in membrana; tale percentuale rimaneva praticamente invariata anche a seguito di irradiazione a 20, 45 o 90 Gy.

Nella seconda fase, in cui si è valutata l'espressione del TfR in membrana e nel citosol, sono stati ottenuti i risultati mostrati nella Tabella 1.

<b>% TfR+</b>	<b>To14 45 Gy</b>	<b>To16 90 Gy</b>	<b>To17 40 Gy</b>	<b>To18 10 Gy</b>	<b>To19 10 Gy</b>	<b>To20 10 Gy</b>	<b>To21 10 Gy</b>
<b>prima</b>	7,00	13,83	0,33	1,09	1,50	0,12	0,12
<b>dopo</b>	53,37	46,15	31,94	7,12	7,89	0,84	0,65

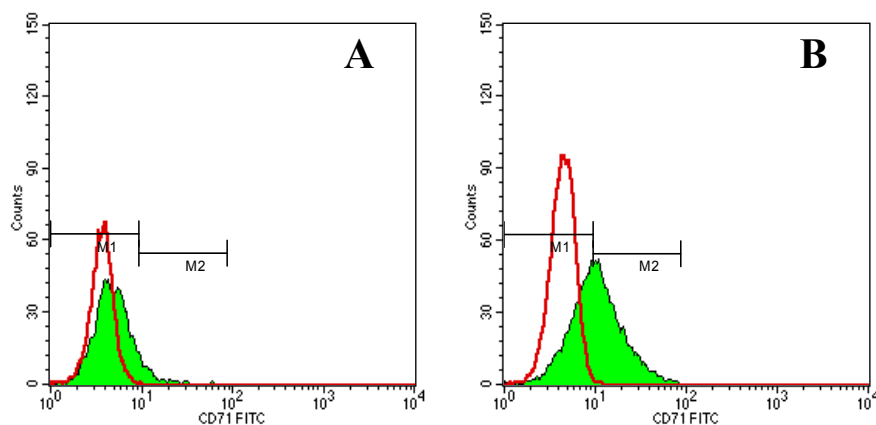
Tabella 1. Percentuali di cellule eritroidi TfR+ misurate al citofluorimetro, prima del trattamento e dopo una settimana. Risultati ottenuti nella seconda fase dello studio.

I dati mostrati derivano dall'analisi citofluorimetrica, che ha restituito i grafici di seguito riportati. Per To14 e To16, sono riportati gli istogrammi che mettono a confronto la frazione di cellule non marcate (M1) con quelle marcate (M2), in condizioni basali e a seguito di irradiazione (Figg. 1, 2).

Per To17, To18, To19, To 20 e To21, esemplari nei quali è stata valutata contemporaneamente l'espressione del TfR e della GPA, i risultati sono riportati in forma differente: sulle ascisse la positività al TfR (o CD71), sulle ordinate la positività alla GPA. Le cellule, rappresentate da punti, che ricadono nel riquadro in basso a sinistra, sono negative al TfR e alla GPA, quelle in alto a sinistra positive solo alla GPA, in basso a destra positive solo al TfR, in alto a destra positive a entrambi (figg. 3, 4, 5, 6, 7). Per ogni esemplari sono mostrati quattro grafici: A e B (condizioni basali), C e D (7 giorni dopo l'irradiazione). In A e C è stata analizzata l'autofluorescenza in cellule non marcate, in B e D la positività in cellule marcate. La percentuale di cellule positive è stata ottenuta dalla

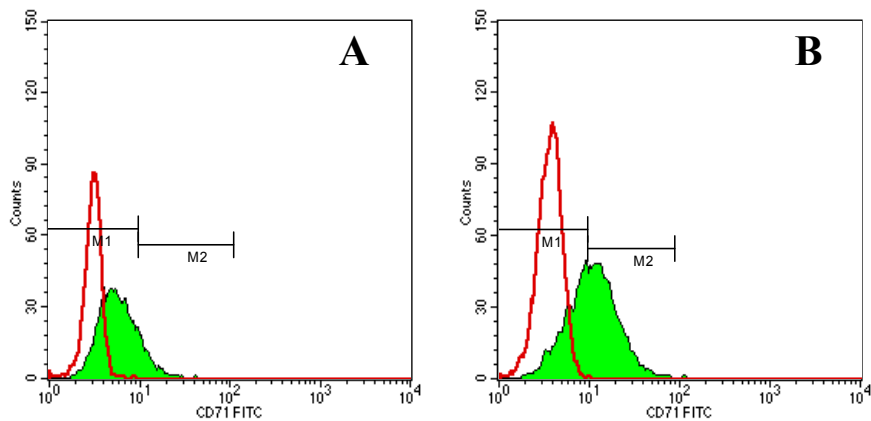
differenza, per ciascun quadrante, tra B e A per il livello basale e tra D e C a seguito di irradiazione.

### To 14



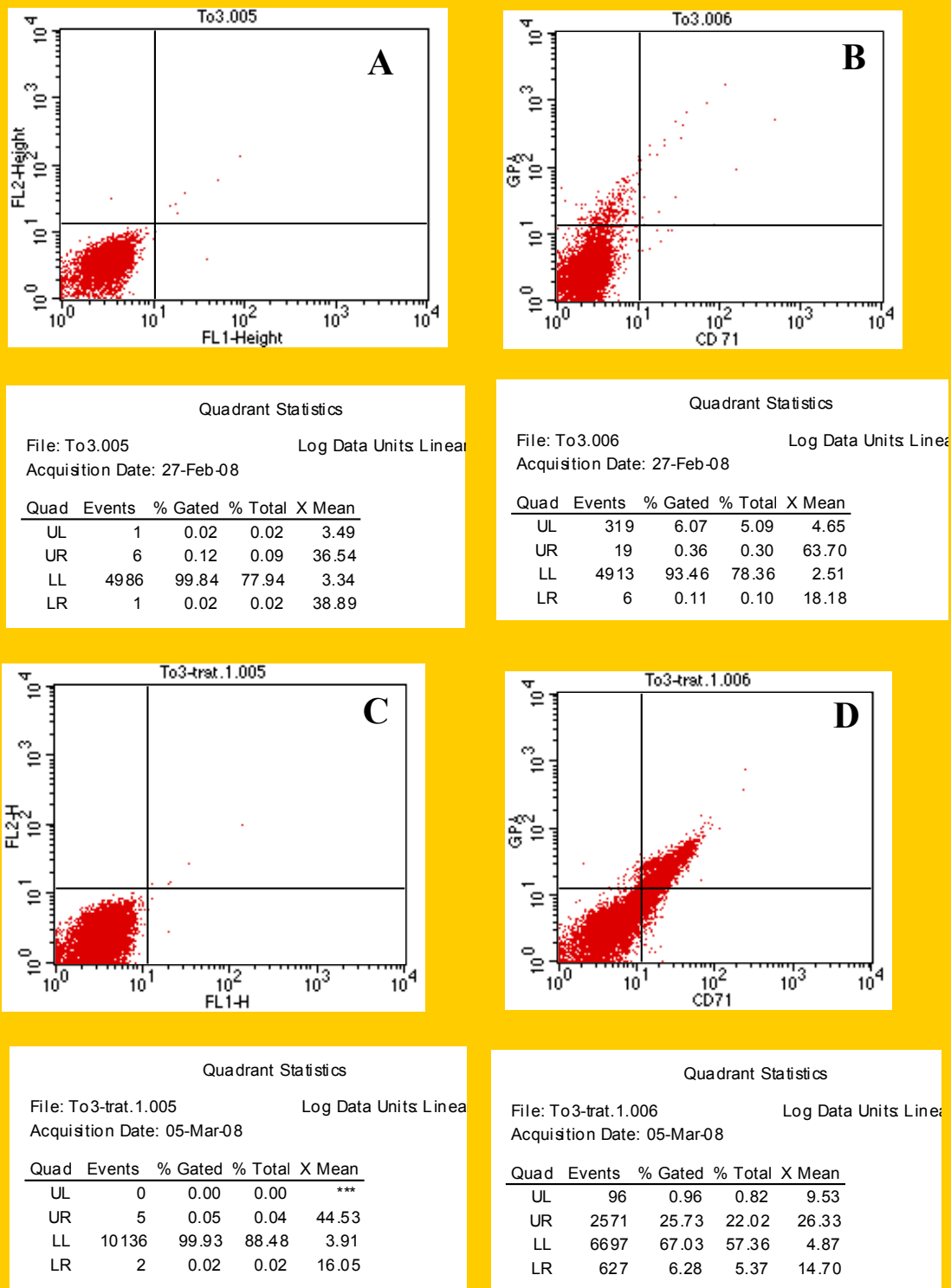
**Figura 1.** Istogrammi relativi all'esemplare To 14, in condizioni basali (A) e 7 giorni dopo l'irradiazione a 45 Gy (B).

### To 16



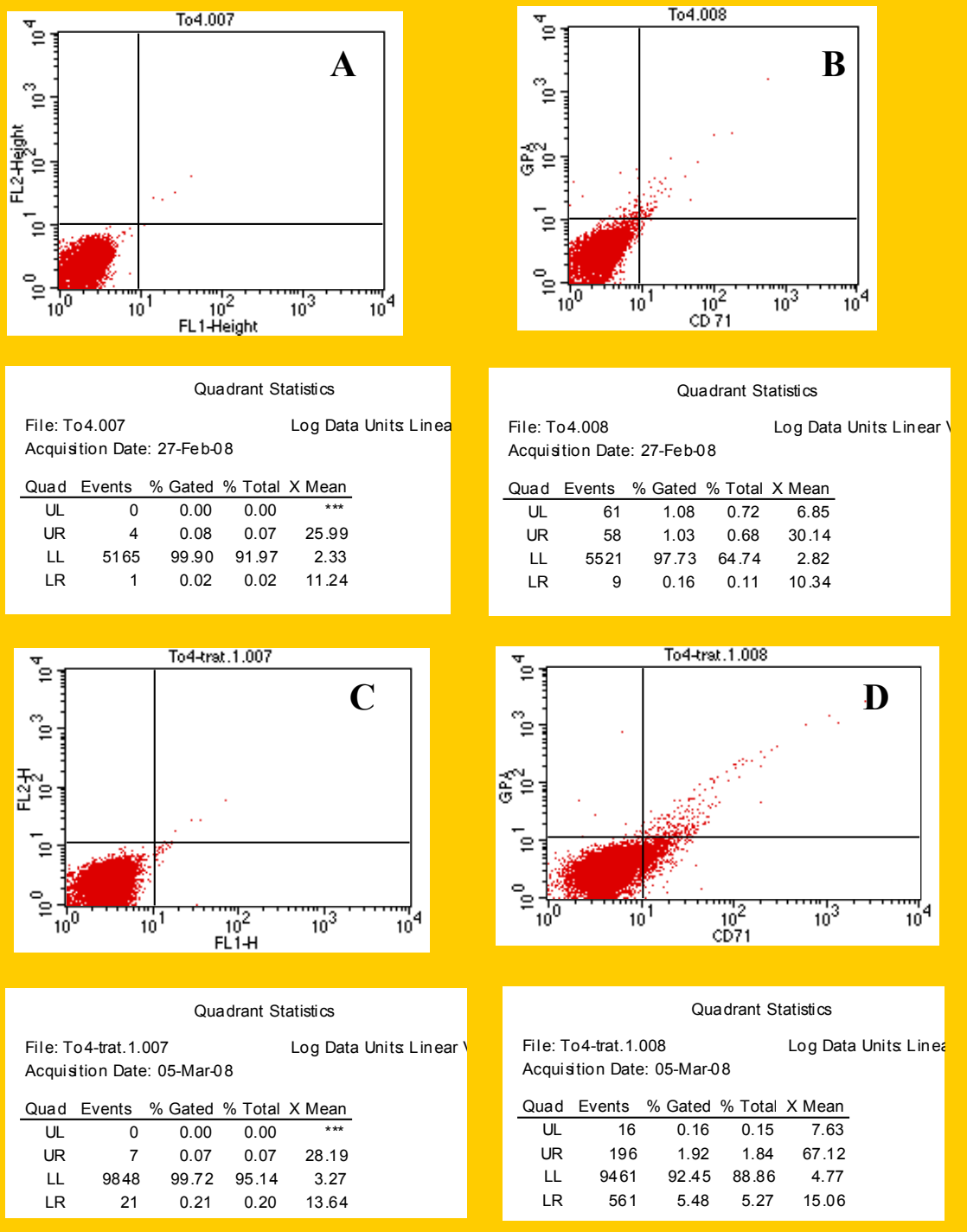
**Figura 2.** Istogrammi relativi all'esemplare To 16, in condizioni basali (A) e 7 giorni dopo l'irradiazione a 90 Gy (B).

## To17



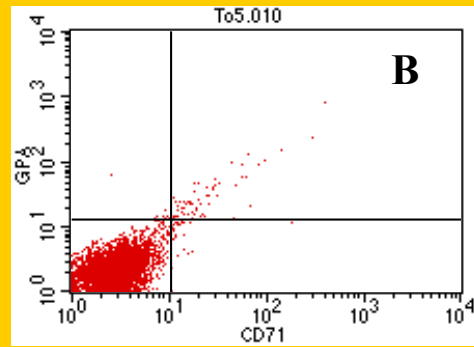
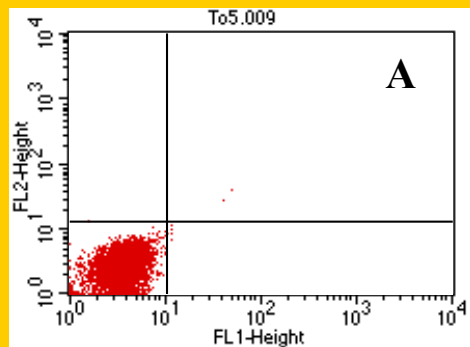
**Figura 3.** Analisi citofluorimetrica dell'espressione del TfR (e contemporaneamente della GPA) nell'esemplare To17, prima (A e B) e dopo (C e D) irradiazione a 40 Gy. La dicitura nella parte alta di ogni riquadro non è identificativa dell'esemplare analizzato, ma corrisponde ad un numero progressivo, attribuito arbitrariamente dall'operatore citofluorimetrista, in base all'ordine di analisi dei preparati.

## To18



**Figura 4.** Analisi citofluorimetrica dell'espressione del TfR (e contemporaneamente della GPA) nell'esemplare To18, prima (A e B) e dopo (C e D) irradiazione a 10 Gy.

## To19



### Quadrant Statistics

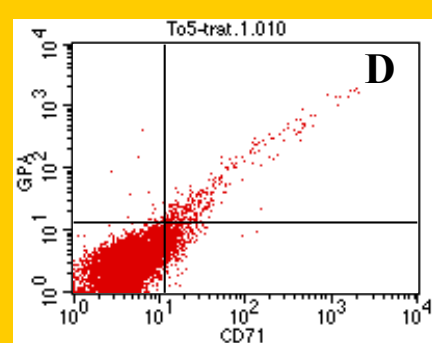
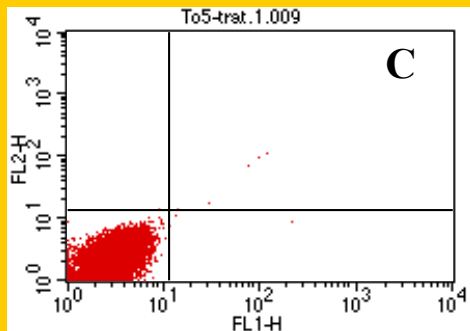
File: To5.009 Log Data Units Linear  
Acquisition Date: 27-Feb-08

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	1	0.02	0.02	1.58
UR	2	0.04	0.03	44.73
LL	4929	99.84	82.66	3.89
LR	5	0.10	0.08	11.61

### Quadrant Statistics

File: To5.010 Log Data Units Linear V  
Acquisition Date: 27-Feb-08

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	8	0.16	0.14	8.01
UR	60	1.20	1.07	39.12
LL	4920	98.20	87.47	3.14
LR	22	0.44	0.39	20.80



### Quadrant Statistics

File: To5-trat.1.009 Log Data Units Linear  
Acquisition Date: 05-Mar-08

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	1	0.01	0.01	8.82
UR	5	0.05	0.05	66.22
LL	9992	99.92	93.72	3.53
LR	2	0.02	0.02	114.86

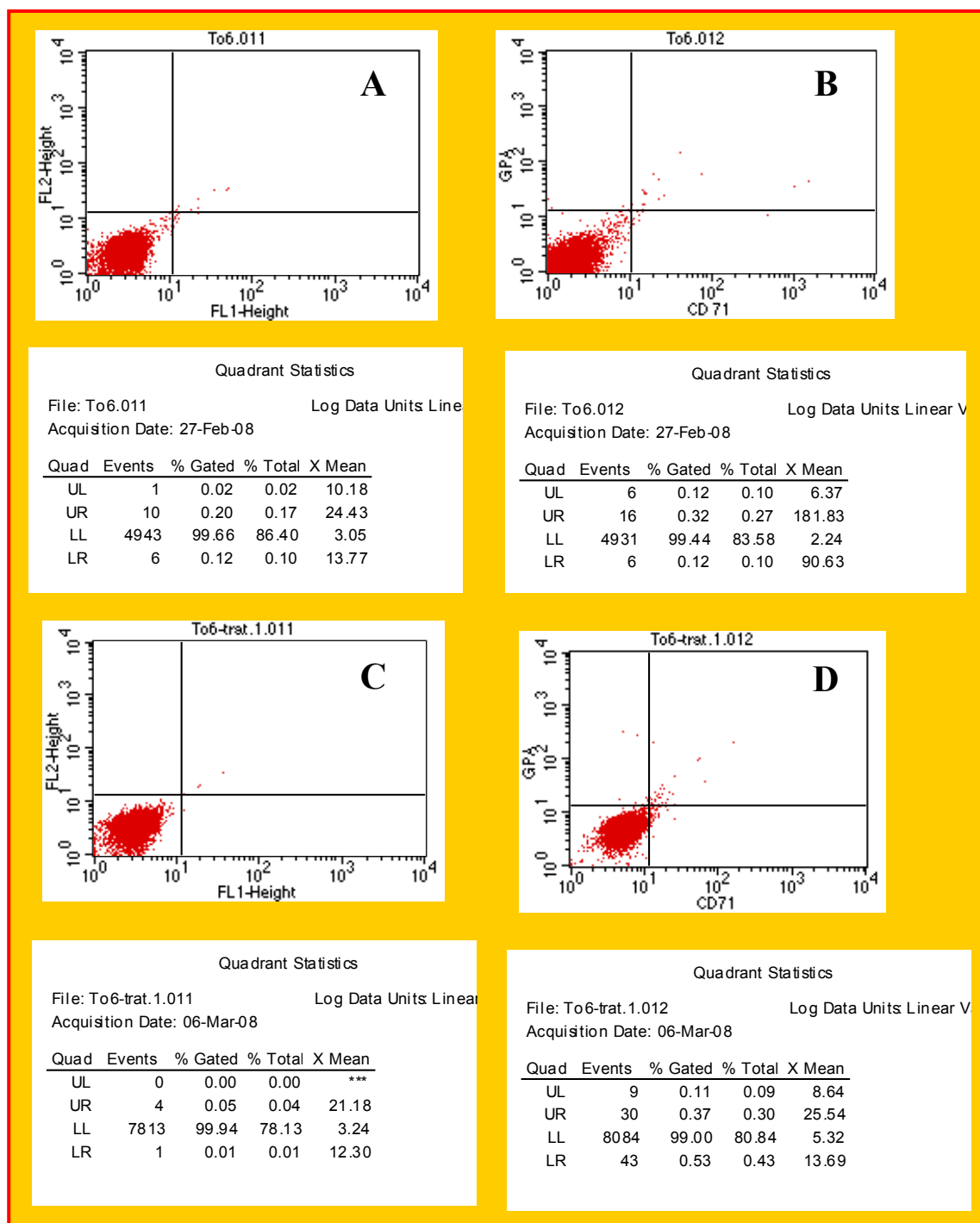
### Quadrant Statistics

File: To5-trat.1.010 Log Data Units Linear V  
Acquisition Date: 05-Mar-08

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	32	0.32	0.29	8.71
UR	304	3.07	2.76	109.03
LL	9076	91.71	82.45	4.65
LR	484	4.89	4.40	15.60

**Figura 5.** Analisi citofluorimetrica dell'espressione del TfR (e contemporaneamente della GPA) nell'esemplare To19, prima (A e B) e dopo (C e D) irradiazione a 10 Gy.

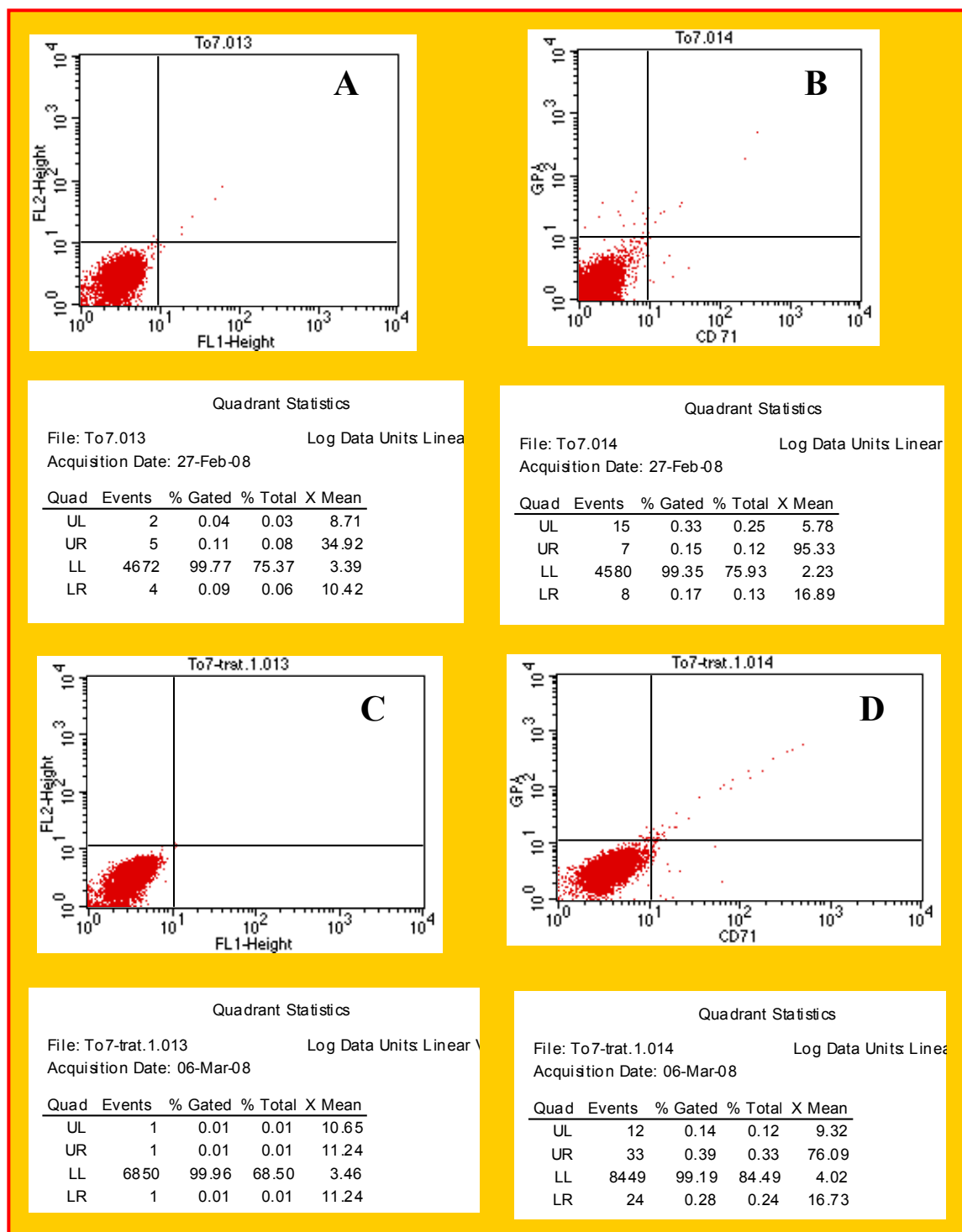
## To20



**Figura 6.** Analisi citofluorimetrica dell'espressione del TfR (e contemporaneamente della GPA) nell'esemplare To20, prima (A e B) e dopo (C e D) irradiazione a 10 Gy.



## To21



**Figura 7.** Analisi citofluorimetrica dell'espressione del TfR (e contemporaneamente della GPA) nell'esemplare To21, prima (A e B) e dopo (C e D) irradiazione a 10 Gy.

Nella torpedine To14 (45 Gy), la percentuale di cellule eritroidi immunopositive al recettore della transferrina (TfR+), rispetto al totale delle cellule eritroidi, è passata dal valore “basale” del 7,00%, prima del trattamento, al 53,37% una settimana dopo l’irradiazione, con un aumento di quasi 8 volte. Una risposta simile è stata osservata in To16 (90 Gy), con valori del 13,83% prima e del 46,15% sempre a distanza di 7 giorni dal trattamento, con un incremento di circa 3 volte.

La massima risposta è stata osservata in To17 (40 Gy): ad una settimana dall’irradiazione, le cellule eritroidi TfR+ erano il 31,94%, contro il valore iniziale dello 0,33%, con un aumento di circa 97 volte. Una risposta omogenea è stata osservata in tutti gli esemplari irradiati sia a 10 che a 40 Gy: in To18 (10 Gy) è stato osservato il 7,12% di cellule immunopositive dopo l’irradiazione, contro il valore basale dell’1,09%; in To19 (10 Gy) il 7,89% contro l’1,50%; in To20 (10 Gy) lo 0,65% contro lo 0,12%; infine in To21 (10 Gy) lo 0,65% contro lo 0,12%. A seguito di irradiazione a 10 Gy, l’aumento registrato è stato in genere di 6-7 volte. Ad eccezione di To17, i dati ottenuti dai vari esemplari, in termini di entità dell’aumento percentuale, sono relativamente omogenei tra loro.

### ***5.1.2 Microscopia a fluorescenza***

L'osservazione al microscopio a fluorescenza delle stesse cellule utilizzate per la valutazione citofluorimetrica del TfR, con il (primo) protocollo di immunofluorescenza solo in membrana, ha mostrato, in condizioni basali (controlli), l'esistenza di una piccola percentuale di cellule che esprimono il TfR in membrana. Tale percentuale non variava significativamente a seguito di irradiazione.

Con il secondo protocollo di immunofluorescenza, che consentiva la rivelazione del TfR internalizzato, è stata riscontrata nei controlli una piccola percentuale di cellule TfR-immunoreattive (Tav. 1, fig. a). A seguito di irradiazione, si osservava un aumento della percentuale di tali cellule eritroidi TfR+, con localizzazione prevalentemente citosolica dell'immunofluorescenza (Tav. 1, fig. b).

### ***5.1.3 Microscopia ottica***

L'osservazione della morfologia cellulare, sugli strisci di sangue colorati con May Grünwald Giemsa, ha evidenziato innanzitutto una risposta all'irradiazione in termini di variazioni delle formule eritroblastiche, che sono state prese in esame in un campione di 5 esemplari: Tm1, Tm3, To4, To5 e To6 (Tabella 2).

		EB (%)	EA (%)	EM (%)
<b>Tm1</b> (45 Gy)	prima	3,2	12,5	84,3
	dopo 3 sett.	1,7	13,7	84,6
<b>Tm3</b> (90 Gy)	prima	2,6	8,7	88,7
	dopo 3 sett.	1,2	4,8	94,0
<b>To4</b> (90 Gy)	prima	0,8	11,3	87,9
	dopo 3 sett.	0,0	2,7	97,3
<b>To5</b> (90 Gy)	prima	1,0	6,8	92,2
	dopo 3 sett.	0,0	3,6	96,4
<b>To6</b> (45 Gy)	prima	1,3	4,5	94,2
	dopo 3 sett.	0,0	3,6	96,4

**Tabella 2.** Confronto tra le formule eritroblastiche osservate in condizioni basali (prima) e a seguito di irradiazione con le dosi riportate (dopo 3 settimane). EB: Eritroblasti Basofili. EA: Eritroblasti Acidofili. EM: Eritrociti (Maturi).

È stata riscontrata, infatti, a seguito di irradiazione, una riduzione percentuale delle forme immature circolanti, eritroblasti basofili ed acidofili, 3 settimane dopo l'irradiazione, fatta eccezione per il piccolo aumento di eritroblasti acidofili in Tm1.

L'osservazione morfologica sugli strisci di sangue di tutti gli animali irradiati, per la rivelazione di micronuclei all'interno di cellule eritroidi, ha dato esito negativo.

L'analisi degli strisci trattati con reazioni immunocitochimiche ha evidenziato un comune andamento della variazione di espressione del TfR a seguito di irradiazione in Tm1 (45 Gy), Tm3 (90 Gy), To4 (90 Gy), To5 (90 Gy) e To6 (45 Gy), in tutte le cellule eritroidi circolanti.

Prima dell'irradiazione, la maggior parte delle cellule risultava negativa all'immunomarcatura per il TfR (Tav. 2, fig. a). Un'eccezione è costituita

dall'esemplare To4, che mostrava un'elevata percentuale di cellule TfR+ già prima dell'irradiazione. A seguito di irradiazione, in tutti gli stadi maturativi, ed in particolare negli eritroblasti acidofili e negli eritrociti maturi, è stato osservato un incremento della percentuale di elementi immunopositivi al TfR, dovuto non tanto all'aumentata espressione del recettore in membrana, quanto ad una sua più ampia diffusione a livello citosolico (Tav. 2, figg. b, c). Nelle cellule immunopositive, la marcatura mostrava un'intensità variabile, anche tra cellule nello stesso stadio di maturazione (Tav. 2, fig. d).

Riassumendo, si può affermare che la percentuale di cellule eritroidi TfR+ nelle torpedini è aumentata per ogni stadio maturativo e con intensità variabile in tutti gli esemplari studiati. I valori delle percentuali di cellule positive al TfR in condizioni basali (controllo) e dopo irradiazione sono riportati di seguito (Tabella 3).

% cell TfR+	Prima	Dopo 3 sett.
<b>Tm1</b> (45 Gy)	1,5	84,7
<b>Tm3</b> (90 Gy)	19,1	36,6
<b>To4</b> (90 Gy)	77,4	89,3
<b>To5</b> (90 Gy)	1,8	69,4
<b>To6</b> (45 Gy)	0,5	84,6

**Tabella 3.** Confronto tra le percentuali di cellule eritroidi TfR+ osservate in condizioni basali (prima) e a seguito di irradiazione con le dosi riportate (dopo 3 settimane).

#### ***5.1.4 Microscopia elettronica***

L'osservazione ultrastrutturale delle cellule eritroidi in condizioni basali è stata condotta per valutare, a confronto, gli effetti dell'irradiazione X. Prima dell'irradiazione, le cellule eritroidi non mostravano alcun segno patologico (Tav. 3, figg. a, b). Dopo l'irradiazione, la matrice cellulare mostrava perdita di densità e, in pochi casi, alterazioni cromatiniche (Tav. 3, fig. c).

Il TfR è stato rivelato a livello ultrastrutturale solo negli esemplari irradiati a 90 Gy. In condizioni basali, una piccola percentuale di cellule eritroidi mostrava debole positività al TfR, prevalentemente a livello della membrana e, in misura minore, nella matrice citoplasmatica (Tav. 3, figg. a, b).

A seguito di irradiazione, la positività al TfR è stata osservata prevalentemente nella matrice citoplasmatica (Tav. 3, fig. d), in membrana (Tav. 3, fig. e), in parte perivescicolare o internalizzata in vescicole (Tav. 3, figg. f, g) e, più raramente, in mitocondri che mostravano danno da irradiazione (Tav. 3, fig. h).

## ***5.2 Risultati per la glicoforina A (GPA)***

### ***5.2.1 Citofluorimetria***

Lo studio citofluorimetrico della glicoforina A (GPA) è stato condotto fin dall'inizio con il protocollo di permeabilizzazione delle cellule per favorire la penetrazione dell'anticorpo. Le analisi hanno dimostrato che, nelle torpedini irradiate con la dose di 10 Gy (To18, To19 e To21), l'irradiazione non produceva sempre lo stesso effetto sull'espressione della GPA (tabella n.2): infatti, mentre in To18 la percentuale di cellule GPA+ rimaneva sostanzialmente invariata 7 giorni dopo il trattamento, negli altri mostrava sempre un incremento.

<b>% GPA+</b>	<b>To17 40 Gy</b>	<b>To18 10 Gy</b>	<b>To19 10 Gy</b>	<b>To20 10 Gy</b>	<b>To21 10 Gy</b>
<b>prima</b>	6,29	2,03	1,30	0,22	0,33
<b>dopo</b>	26,64	2,01	3,33	0,43	0,51

Tabella n.2. Percentuali di cellule eritroidi GPA+ misurate al citofluorimetro, prima del trattamento e dopo una settimana.

In To20 (10 Gy) è stato osservato lo 0,43% di cellule positive dopo irradiazione, contro il valore iniziale dello 0,22%; tale aumento, che è pari a circa il doppio, è stato riscontrato anche in To19 (10 Gy), con il 3,33% contro l'1,30%, e To21 (10 Gy), con lo 0,51% contro lo 0,33%. In To17 (40 Gy), la percentuale di cellule GPA+ è aumentata di circa 4 volte, dal 6,29% al 26,64% (grafici già riportati nel par. 5.1.1).

### ***5.2.2 Microscopia a fluorescenza***

Le stesse cellule analizzate al citofluorimetro, entro breve tempo sono state osservate anche al microscopio a fluorescenza: è stato riscontrato un aumento della percentuale di cellule immunopositive a seguito di irradiazione, in 4 dei 5 esemplari testati, mentre in uno di questi, To18 (10 Gy), il trattamento sembrava non aver sortito alcun effetto sull'espressione della GPA.

### ***5.2.3 Microscopia ottica***

L'espressione della GPA è stata valutata in To4 (90 Gy), To5 (90 Gy), To6 (45Gy), To17 (40 Gy), To18 (10 Gy), To19 (10 Gy) e To20 (10 Gy), in condizioni basali ed una settimana dopo l'irradiazione.

Nelle torpedini piccole, To18, To19 e To20, irradiate a 10 Gy, le cellule eritroidi mostravano una scarsa positività per la GPA prima del trattamento, che rimaneva pressoché invariata a seguito di irradiazione.

Nelle torpedini To6 (45 Gy), To17 (40 Gy), le cellule eritroidi mostravano scarsa positività immunocitochimica alla glicoforina A in condizioni basali (Tav. 4, figg. a, b), mentre sette giorni dopo l'irradiazione, si poteva osservare una debole positività, prevalentemente a livello perivacuolare (Tav. 4, figg. c, d).

Nelle cellule eritroidi delle torpedini To4 e To5, è stata osservata una marcatura perivescicolare già prima dell'irradiazione (Tav. 4, fig. e); dopo l'irradiazione a 90 Gy, l'immunopositività perivacuolare è risultata più intensa e



localizzata in un maggior numero di vacuoli, rispetto ai controlli (Tav. 4, figg. f, g, h).

#### ***5.2.4 Microscopia elettronica***

La GPA è stata rivelata a livello ultrastrutturale negli esemplari irradiati con dosi di 70, 80 e 90 Gy. Prima dell'irradiazione, le cellule eritroidi delle torpedini mostravano una debole espressione della GPA in membrana (Tav. 5, figg. a, b), a livello mitocondriale (Tav. 5, figg. a, b) e perivescicolare (Tav. 5, fig. c).

Dopo l'irradiazione a 70 Gy, sono stati osservati una debole immunomarcatura per la GPA a livello di membrana (Tav. 5, fig. a), una marcatura più diffusa a livello citosolico (Tav. 5, figg. a, b) ed una scarsa internalizzazione in vescicole e in mitocondri (Tav. 5, fig. b).

A seguito dell'irradiazione a 80 Gy, le cellule eritroidi mostravano un piccolo aumento dell'espressione della GPA in membrana (Tav. 5, fig. c) ed un incremento nel citosol, nelle vescicole e nei mitocondri (Tav. 5, fig. d).

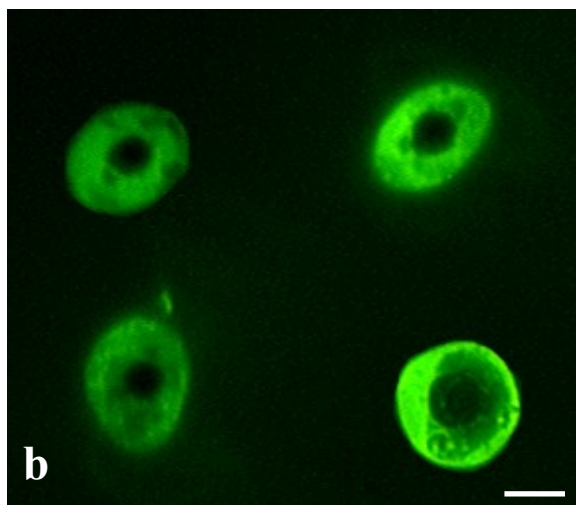
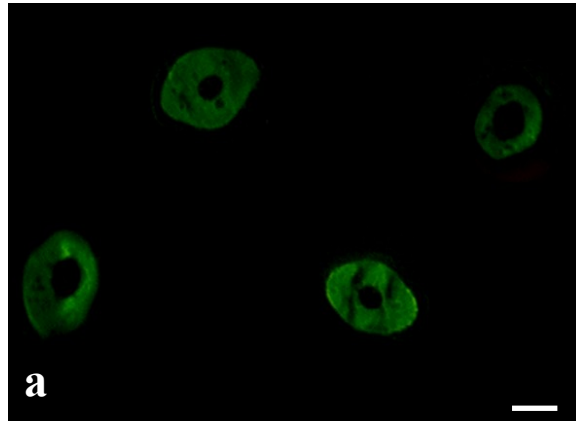
Infine, l'irradiazione a 90 Gy ha prodotto un aumento moderato di espressione in membrana (Tav. 5, fig. e) e a livello perivescicolare (Tav. 5, fig. f). La positività appariva aumentata e distribuita quasi uniformemente nei mitocondri e nel citosol (Tav. 5, fig. f).

## ***Tavola 1***

Risultati dell'immunomarcatura di cellule eritroidi di torpedine con anticorpo anti-TfR FITC. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ .

**a.** Scarsa positività immunocitochimica prima dell'irradiazione.

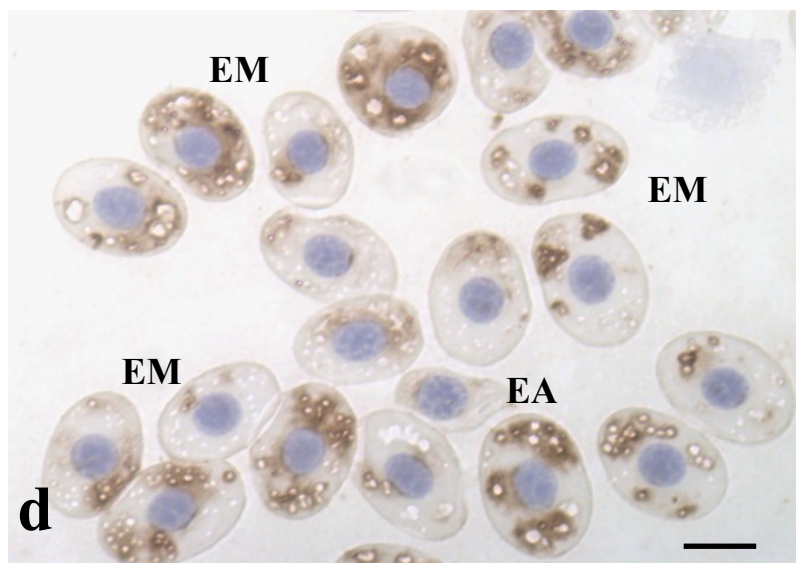
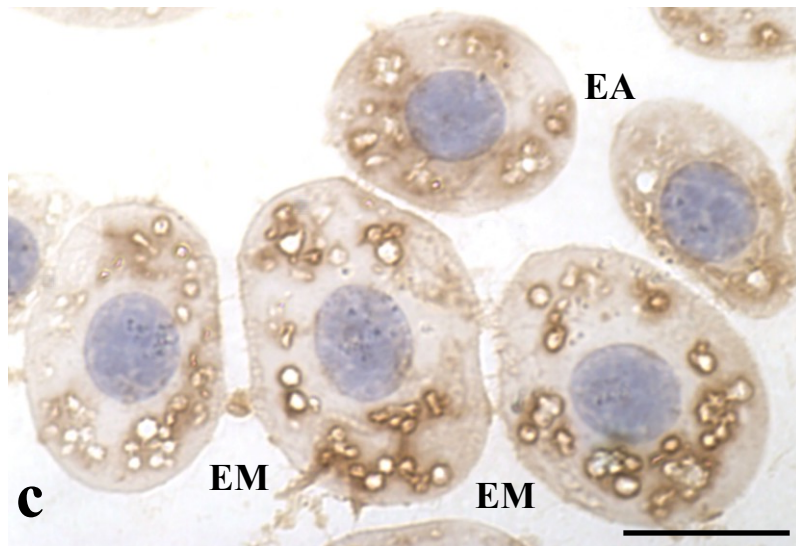
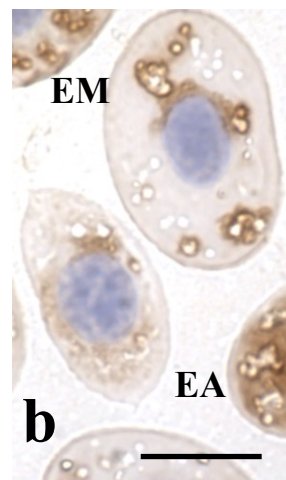
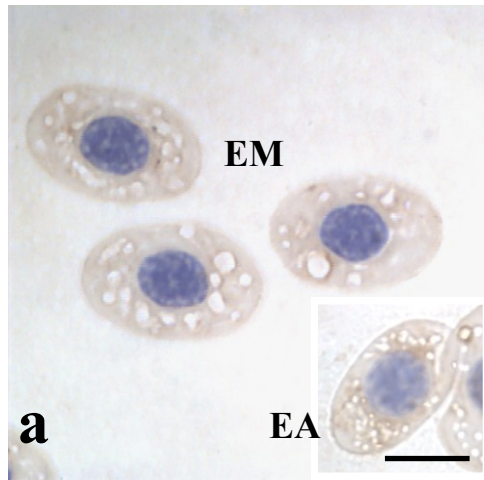
**b.** Aumento della percentuale di cellule eritroidi TfR<sup>+</sup>, con immunofluorescenza localizzata nel citosol.



## ***Tavola 2***

Risultati delle reazioni immunocitochimiche per il recettore della transferrina, osservati al microscopio ottico. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ .

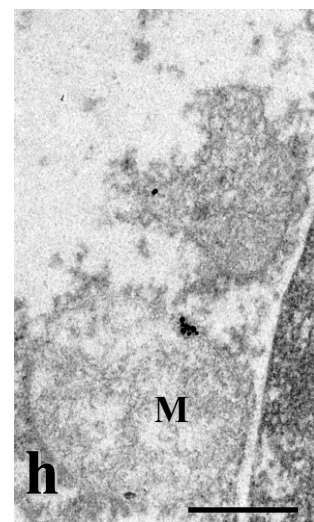
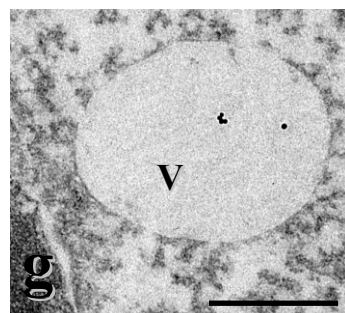
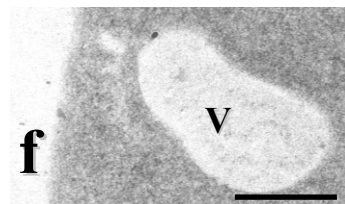
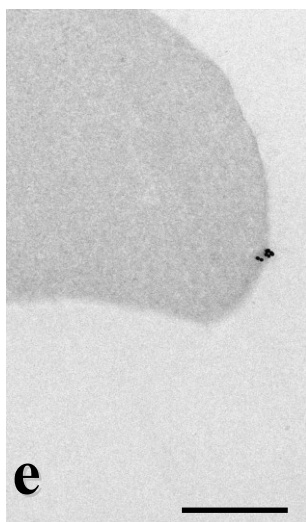
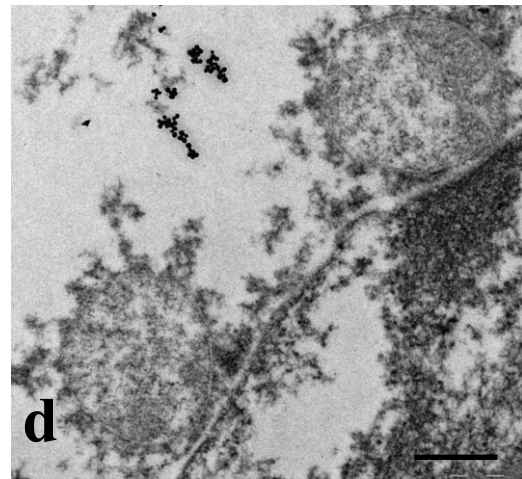
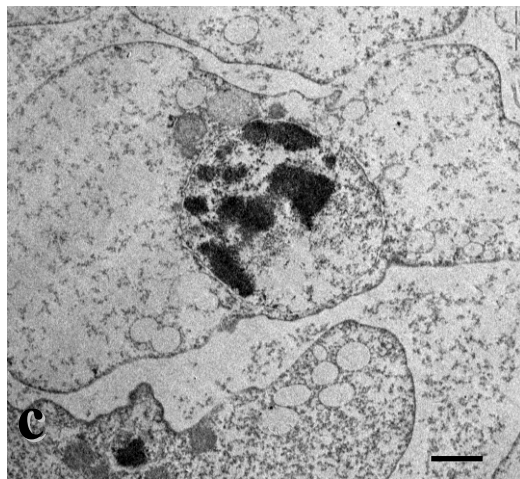
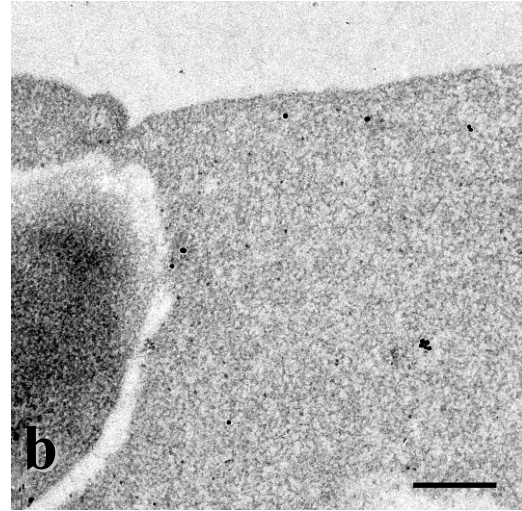
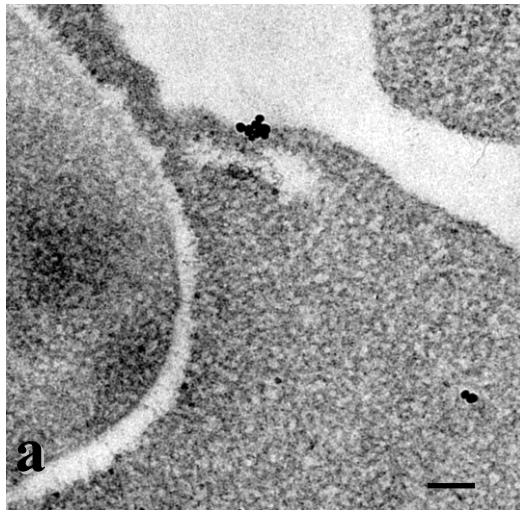
- a.** La maggior parte delle cellule eritroidi circolanti appariva negativa al TfR, prima dell'irradiazione. Qui sono mostrati gli eritrociti maturi (EM) ed un eritroblasto acidofilo (EA), nel riquadro in basso a destra.
- b.** A seguito di irradiazione, è stata osservata marcatura prevalentemente a livello del citosol e intorno a vescicole.
- c.** Positività immunocitochimica negli eritroblasti acidofili (prevalentemente citosolica) e negli eritrociti maturi (più intensa intorno a vescicole).
- d.** Diversa intensità di espressione del TfR nelle cellule eritroidi, a seguito di irradiazione.



### ***Tavola 3***

Risultati delle reazioni immunocitochimiche per il TfR, osservati al microscopio elettronico (immunopositività visualizzata attraverso particelle di oro colloidale). M = mitocondrio, V = vescicola. Scale bar = 0,5  $\mu\text{m}$  in a, b, d, e, f; 2,0  $\mu\text{m}$  in c.

- a.** Debole positività immunocitochimica nella membrana di un eritrocito maturo, prima dell'irradiazione.
- b.** Debole positività immunocitochimica nella matrice citoplasmatica di un eritrocito maturo, prima dell'irradiazione.
- c.** Alterazioni morfologiche della cromatina, dopo l'irradiazione, e perdita di densità della matrice.
- d.** Immunopositività nel citosol, a seguito di irradiazione.
- e.** Marcatura in membrana.
- f.** Marcatura sulla membrana di una vescicola.
- g.** Marcatura intravescicolare
- h.** Immunopositività in un mitocondrio danneggiato dall'irradiazione.

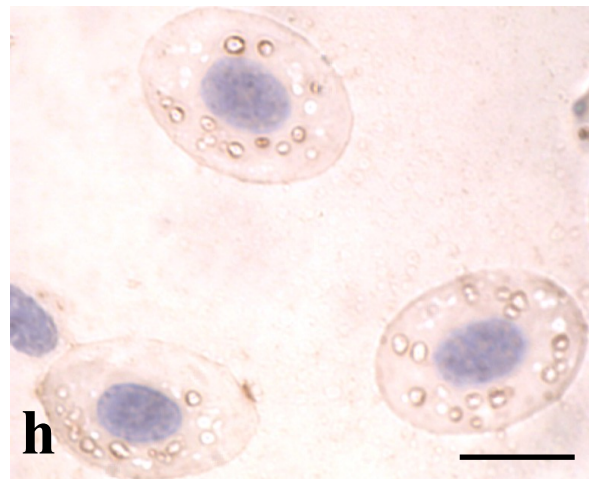
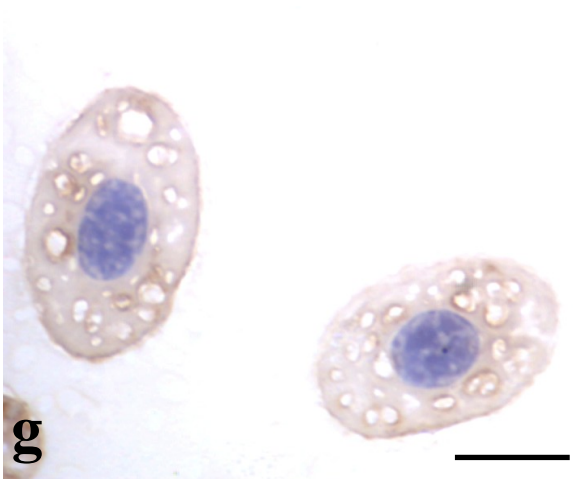
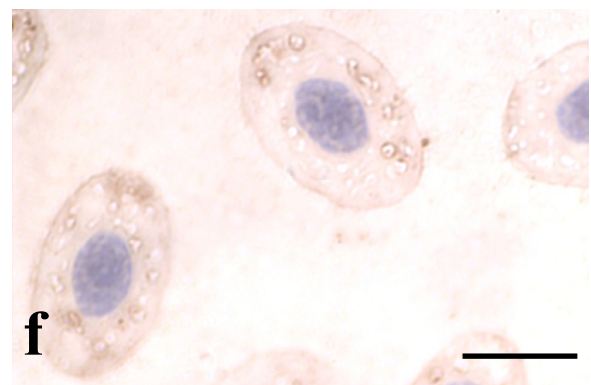
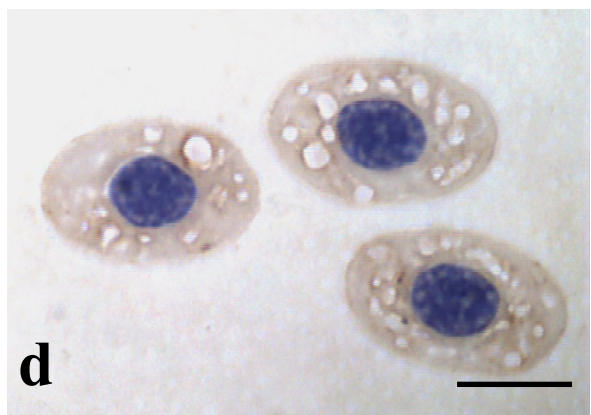
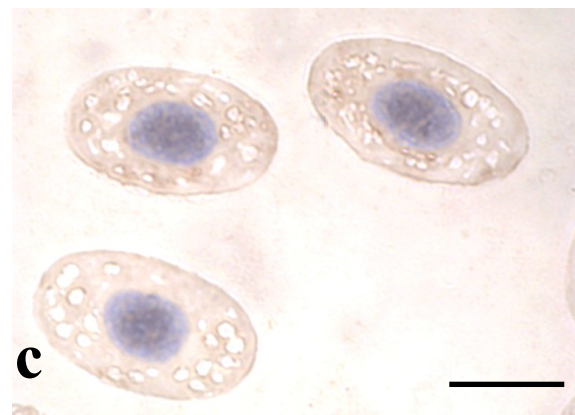
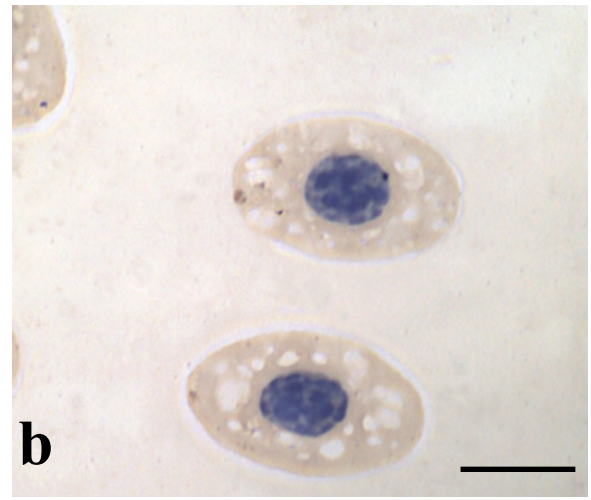
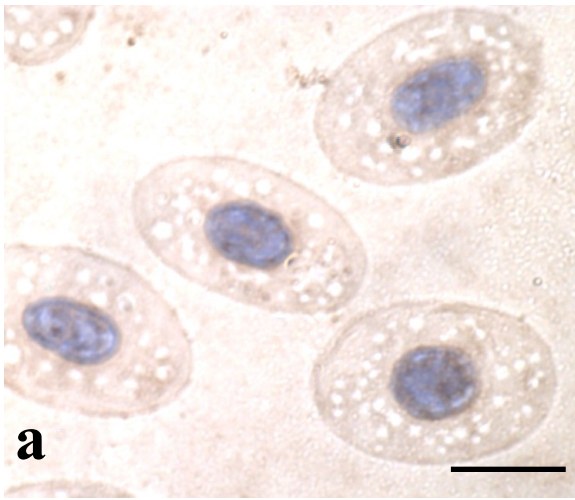


### ***Tavola 4***

Risultati delle reazioni immunocitochimiche per la glicoforina A, osservati al microscopio ottico. Scale bar = 10  $\mu$ m.

- a.** Cellule completamente negative alla reazione per la GPA, prima dell'irradiazione.
- b.** Scarsa espressione della glicoforina A, prima dell'irradiazione.
- c, d.** Debole positività perivacuolare, a seguito di irradiazione a 40 Gy.
- e.** Debole positività perivacuolare, prima dell'irradiazione 90 Gy.
- f, h.** Intensa positività perivacuolare, dopo l'irradiazione 90 Gy.
- g, h.** Aumento del numero di vacuoli positivi alla glicoforina A e dell'intensità della marcatura, dopo irradiazione a 90 Gy.

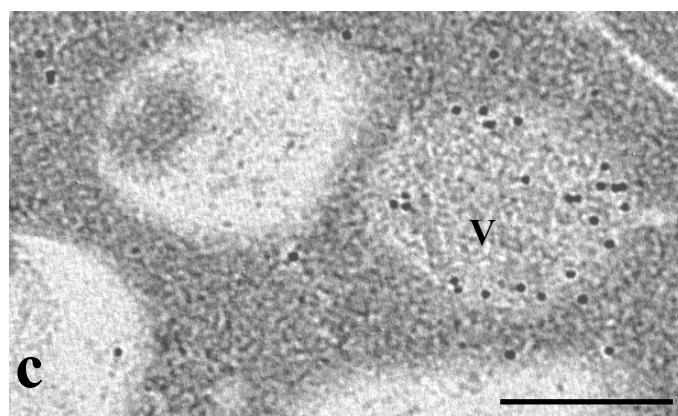
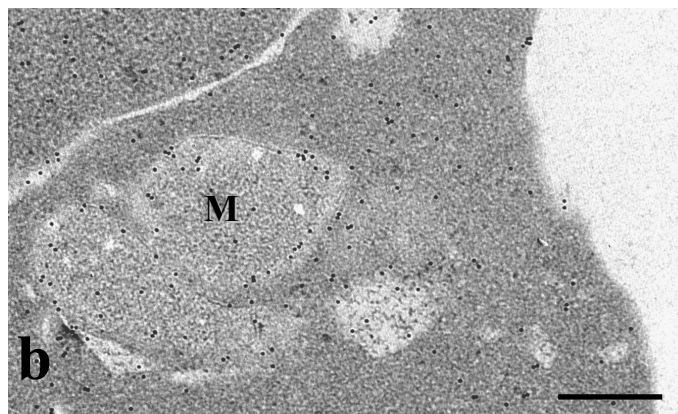
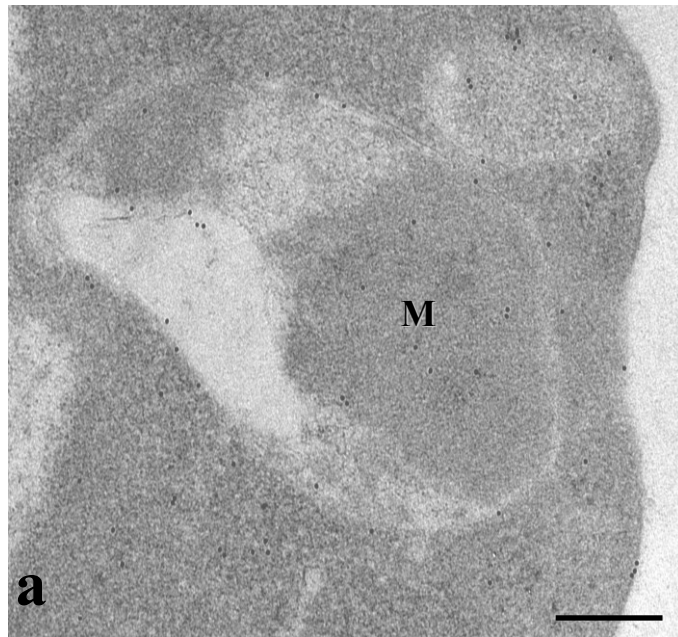




## ***Tavola 5***

Risultati delle reazioni immunocitochimiche per la glicoforina A, osservati al microscopio elettronico. Torpedini non irradiate. M = mitocondrio, V = vescicola. Scale bar = 1  $\mu\text{m}$  in a, 0,5  $\mu\text{m}$  in b, c.

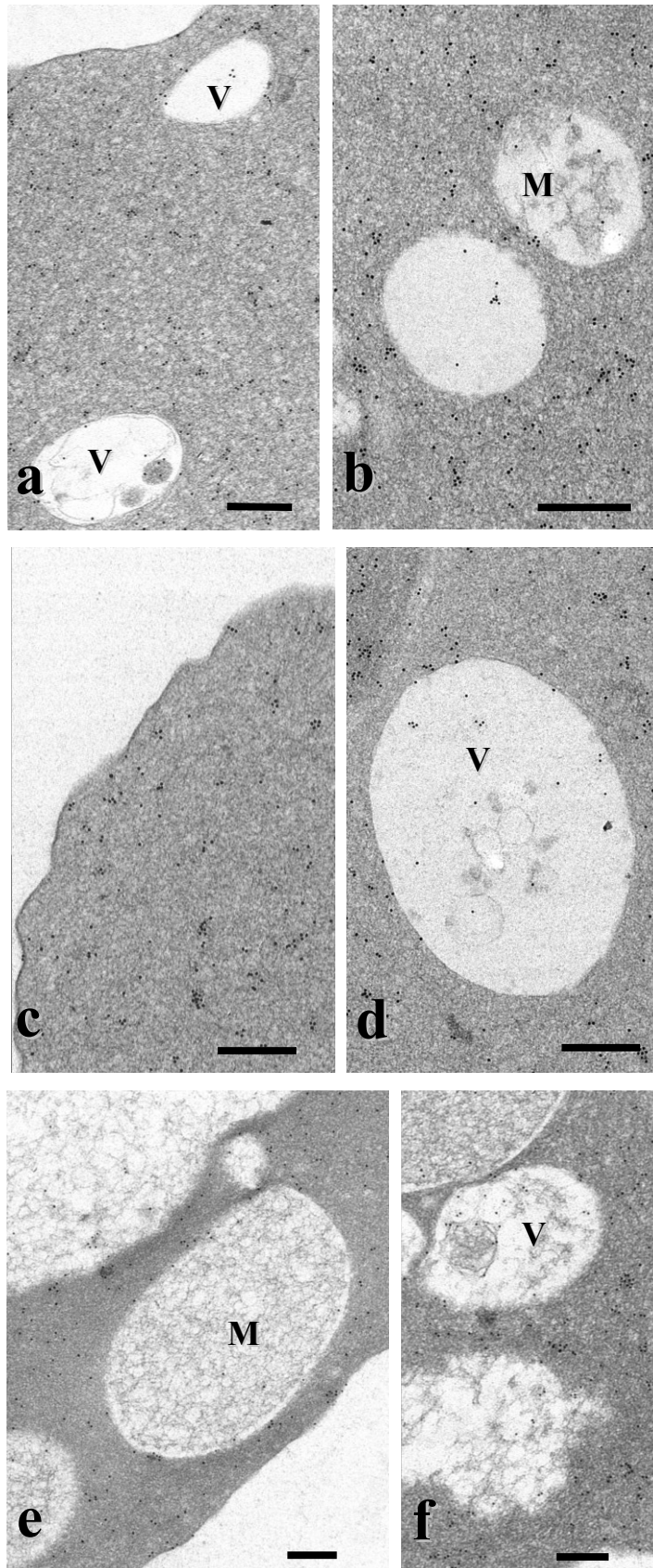
- a.** Scarsa immunomarcatura di membrana e su creste mitocondriali.
  
- b.** Positività nella membrana plasmatica e a livello mitocondriale. Diffusa positività citosolica.
  
- c.** Immunomarcatura perivescicolare.



## ***Tavola 6***

Risultati delle reazioni immunocitochimiche per la glicoforina A, osservati al microscopio elettronico. Torpedini irradiate. M = mitocondrio, V = vescicola. Scale bar = 0,5  $\mu$ m.

- a.** Scarso aumento a livello vescicolare e scarsa immunomarcatura di membrana, in eritrocito di torpedine irradiata a 70 Gy.
- b.** Scarsa immunomarcatura mitocondriale ed aumento della positività citosolica, dopo irradiazione a 70 Gy.
- c.** Debole espressione in membrana e intensa positività a livello citosolico. Irradiazione a 80 Gy.
- d.** Positività in vescicola nell'eritrocito di una torpedine irradiata a 80 Gy.
- e.** Scarso aumento dell'espressione della GPA in membrana ed aumento della positività mitocondriale. Irradiazione a 90 Gy.
- f.** Positività immunocitochimica in una vescicola e nel citosol. Irradiazione a 90 Gy.



## ***Capitolo 6***

### ***DISCUSSIONE E CONCLUSIONI***

#### ***6.1 Il recettore della transferrina (TfR)***

L'analisi citofluorimetrica ha dimostrato che, a seguito di irradiazione, in tutte le torpedini aumenta la percentuale di cellule eritroidi circolanti che esprimono il TfR. Tale variazione, di entità simile in tutte le torpedini, è dovuta non tanto ad un aumento dell'espressione in membrana, come dimostrato nella prima fase degli esperimenti, quanto all'internalizzazione del recettore, dimostrata nella seconda fase. Questo dato è stato confermato dalle osservazioni al microscopio a fluorescenza, eseguite subito dopo l'analisi al citofluorimetro.

L'osservazione degli strisci di sangue, colorati con May Grünwald Giemsa, ha evidenziato una riduzione in circolo delle cellule eritroidi più immature, gli eritroblasti basofili ed acidofili, più marcata per i basofili, a seguito di irradiazione. Tali cellule sono molto immature, quasi blastiche, e normalmente sono presenti in percentuali molto variabili, dipendenti dall'età e dall'attività emopoietica dell'animale, che a sua volta dipende anche dal periodo stagionale, del quale risentono tutti i Vertebrati ectotermi (Glomski & Pica, 2004). Per questi motivi, gli eritroblasti basofili non si rinvenivano sempre in percentuale costante nel sangue circolante di tutte le torpedini, pertanto è sembrato normale che alcuni degli esemplari studiati avessero bassissime percentuali di eritroblasti basofili in circolo prima dell'irradiazione. A seguito di irradiazione, la riduzione della loro percentuale, o in alcuni casi la completa

deplezione, è verosimilmente conseguente ad una riduzione dell'eritropoiesi, a sua volta imputabile al danno alla milza, che in questi animali è l'esclusivo organo eritropoietico (Pica & Della Corte, 1987).

Le reazioni immunocitochimiche in microscopia ottica hanno dimostrato che, in condizioni basali, la maggior parte delle cellule eritroidi non esprime il TfR e che la sua espressione è variabile nei diversi esemplari. L'irradiazione induce un aumento percentuale di cellule immunopositive ed una riduzione o scomparsa delle forme immature: l'espressione aumentata di TfR è inoltre localizzata preferenzialmente all'interno nel citoplasma. La percentuale di cellule che esprimono il recettore rimane variabile nei diversi esemplari di questo gruppo, per il quale sono state eseguite le reazioni immunocitochimiche sugli strisci di sangue. Le analisi citofluorimetriche per questo stesso gruppo sono state effettuate secondo il protocollo mirato alla sola rivelazione del recettore in membrana; da tali analisi è risultato che l'espressione del TfR in membrana rimane pressoché costante a seguito di irradiazione. Se si confronta invece il risultato delle suddette reazioni su strisci di sangue, con la valutazione citofluorimetrica su altri esemplari, realizzata con il secondo protocollo (rivelazione del recettore internalizzato, oltre che in membrana), è evidente che dalle reazioni su vetrino, mediamente, risulta una percentuale di cellule positive, dopo l'irradiazione, molto maggiore di quella misurata in media dal citofluorimetro. Tale differenza, se non dovuta a variazioni individuali nella risposta all'irradiazione, potrebbe essere ascritta ai diversi anticorpi utilizzati:



per la citofluorimetria è stato usato un anticorpo monoclonale, l'unico coniugato ad un fluorocromo, disponibile in commercio; per la microscopia ottica è stato utilizzato un anticorpo policlonale, probabilmente in grado di riconoscere un maggior numero di epitopi.

Un'ulteriore conferma dell'aumento dell'espressione del TfR a seguito di irradiazione è stata ottenuta con le osservazioni al microscopio elettronico, che hanno parallelamente evidenziato le alterazioni ultrastrutturali conseguenti all'irradiazione: alterazioni della compattazione della cromatina, perdita di densità della matrice citoplasmatica e alterazioni dei mitocondri, che presentano danni alle membrane. Prima dell'irradiazione, solo poche cellule esprimono il TfR, principalmente in membrana e più raramente nella matrice citoplasmatica. A seguito di irradiazione, si è osservata internalizzazione del recettore nel citosol, in vescicole e, occasionalmente, in mitocondri danneggiati. Tali osservazioni concordano con i dati ottenuti in microscopia ottica.

Tutte le metodiche utilizzate hanno dimostrato, dunque, che l'esposizione delle torpedini ai raggi X causa un aumento dell'espressione del TfR nel citoplasma delle cellule eritroidi circolanti. In condizioni normali, il recettore della transferrina viene internalizzato durante il processo di captazione della transferrina da parte della cellula: tale via è stata ampiamente studiata (Trowbridge, 1988; Richardson & Ponka, 1997; Ponka & Lok, 1999; Kwok & Richardson, 2002; Li et al., 2002; Qian et al., 2002; Aisen et al., 2004; Pantopoulos, 2004; Gomme et al., 2005). La transferrina, dopo aver legato il



ferro, si lega al suo recettore ed entrambi sono internalizzati in vescicole rivestite di clatrina, con un classico meccanismo di endocitosi mediata dal recettore. Tuttavia, è stata anche osservata l'internalizzazione del recettore, indipendentemente dal legame della transferrina (Taetle, 1990; Trowbridge et al., 1993; Kurten, 2003). Normalmente, gli altri recettori, ad esempio il recettore del fattore di crescita dell'epidermide, sono internalizzati solo dopo l'interazione con il proprio ligando. Inoltre, circa il 10% del TfR riciclato va incontro ad una via di riciclaggio più lenta attraverso il complesso del Golgi (Ponka & Lok, 1999).

Ancora non è chiaro il motivo per cui il recettore della transferrina, che pure viene internalizzato in condizioni normali, presenti una marcata internalizzazione a seguito dell'insulto da radiazioni. Alla luce di quanto riportato da Taetle (1990), Trowbridge et al. (1993) e Kurten (2003), si può ipotizzare che l'irradiazione comporti una modificazione della struttura del recettore, tale da incrementare la sua internalizzazione senza il legame con la transferrina. In tal caso, a seguito di irradiazione, un gran numero di molecole del recettore verrebbe a trovarsi nel citoplasma, più di quanto ve ne sia in membrana. Alternativamente, si potrebbe ipotizzare che l'irradiazione causi qualche modificazione nella struttura del recettore, che ne impedirebbe la ricollocazione in membrana, dopo la fisiologica internalizzazione per l'endocitosi della transferrina. Indipendentemente dal meccanismo, sta di fatto che un aumento dell'espressione del recettore si manifesta in tutti gli esemplari

trattati con le dosi di radiazioni utilizzate finora; tuttavia, il recettore della transferrina potrà essere considerato un *biomarker* di inquinamento solo se si mostrerà sensibile a dosi di radiazioni via via più basse, rispetto a quelle già utilizzate.

Un sistema ampiamente utilizzato per la determinazione dell'effetto genotossico, dovuto all'esposizione ad agenti chimici o a radiazioni, è il test di rivelazione dei micronuclei (Dertinger et al., 2002; Dertinger et al., 2003; Chen et al., 2004; Liu et al., 2009). I micronuclei sono corpuscoli intracitoplasmatici liberi, di forma tondeggianti o ovalare, circondati da membrana, simili al nucleo per struttura e colorazione. A seguito di danno al DNA e relativa frammentazione cromosomica, i micronuclei si formano al termine di una divisione cellulare dalla condensazione dei frammenti di cromosomi o da cromosomi interi che rimangono indietro durante i movimenti dell'anafase, per cui vengono esclusi dai due nuclei figli; essi vengono ritenuti, pertanto, indicatori di danno citogenetico.

Nei Mammiferi, il test dei micronuclei è effettuato su cellule selezionate, i reticolociti più immaturi appena immessi in circolo, che si contraddistinguono per elevati livelli di espressione del TfR. Il riscontro di eritrociti maturi con micronuclei è un evento estremamente raro, in quanto esiste un meccanismo di selezione splenica, che rimuove dal circolo gli eritrociti "difettosi".

Tuttavia, poiché finora non sono stati mai osservati micronuclei nelle cellule del sangue delle torpedini, sembra che il test dei micronuclei non sia un

*marker* molto sensibile per la valutazione della risposta delle torpedini all'insulto da radiazioni X.

In conclusione, con i risultati finora acquisiti, è possibile affermare che l'espressione del TfR aumenta, in alcuni casi in modo notevole, a seguito di irradiazione a dosi alte; ulteriori esperimenti con dosi progressivamente inferiori di raggi X potranno consentire una stima della sensibilità del recettore, così da giustificare l'interesse del suo impiego quale *biomarker* di inquinamento da radiazioni in ambiente marino. Un ulteriore obiettivo sarà quello di determinare l'eventuale relazione dose-risposta, già riscontrata nel caso di eritrociti umani (Gong et al., 1999).

## 6.2 La glicoforina A (GPA)

Lo studio citofluorimetrico della GPA ha evidenziato che la risposta all'irradiazione differisce nei vari esemplari. In torpedini irradiate a 10 Gy, in alcuni casi non è stata riscontrata variazione dell'espressione della GPA a seguito di irradiazione, in altri è stato visto un incremento. L'irradiazione a 40 Gy ha, invece, prodotto una sensibile risposta nell'esemplare To17. Questo dato è stato confermato dalle osservazioni delle stesse cellule al microscopio a fluorescenza, immediatamente dopo l'analisi al citofluorimetro.

Una grande variabilità nell'espressione della GPA, sia prima, sia dopo l'irradiazione, è stata riscontrata anche sugli strisci di sangue trattati con reazioni immunocitochimiche. Esse hanno dimostrato, infatti, che: in alcuni esemplari, l'espressione della GPA è scarsa in condizioni basali e rimane pressoché invariata a seguito di irradiazione a 10 Gy; in altri esemplari, si osservano una scarsa espressione della GPA prima dell'irradiazione e l'internalizzazione della stessa a livello perivacuolare, dopo irradiazione a 40 o 45 Gy; infine, in altri esemplari è stata dimostrata un'espressione della GPA a livello perivacuolare prima dell'irradiazione, che a seguito di irradiazione è risultata più intensa e localizzata in un maggior numero di vacuoli. L'inalterata espressione della GPA, dopo irradiazione a 10 Gy, sembra un fattore assolutamente critico per il suo utilizzo come *biomarker* di inquinamento da radiazioni.

Le osservazioni ultrastrutturali hanno rivelato, in condizioni basali, una debole espressione della GPA in membrana, a livello mitocondriale e

perivescicolare. Dopo irradiazione a dosi di 70, 80 o 90 Gy, è stato riscontrato un generale, moderato aumento dell'espressione della GPA con la stessa localizzazione osservata prima dell'irradiazione.

I dati ottenuti suggeriscono che la GPA non può essere considerata un buon marcatore di danno eritrocitario da radiazioni, in quanto sia l'analisi al citofluorimetro, condotta con il secondo protocollo (rivelazione della glicoproteina internalizzata), sia le reazioni immunocitochimiche su vetrino, hanno dimostrato che l'espressione della GPA rimane pressoché invariata nelle torpedini irradiate a 10 Gy. Sembra del tutto improbabile, alla luce dei risultati finora ottenuti, che la GPA possa mostrare sensibilità a dosi più basse di quelle già utilizzate, pertanto si esclude la prosecuzione della sperimentazione in merito.

### ***6.3 Considerazioni finali***

In base ai risultati ottenuti, si può concludere che, tra il TfR e la GPA, il solo TfR ha dimostrato variazioni significative indotte da insulto da raggi X. La prosecuzione di questo studio, per determinare il grado di sensibilità a dosi minime di radiazioni e l'eventuale relazione dose-risposta, già riscontrata nel caso di eritrociti umani (Gong et al., 1999), consentirà di mettere a punto un sistema di biomonitoraggio, certamente più sensibile del test dei micronuclei, per individuare le aree marine soggette ad inquinamento da radiazioni. Tale metodo, già brevettato dal gruppo di ricerca del prof. Chester Glomski (Università di New York, Buffalo) nei Mammiferi, potrebbe consentire in futuro, se applicato anche ad altri Vertebrati (Anfibi e Rettili), di monitorare le condizioni di vari habitat lacustri, fluviali, terrestri, eventualmente con l'impiego di un kit di rivelazione dei suddetti markers, mediante cioè un metodo semplice e relativamente economico.

## ***Bibliografia***

**Aisen P., 2004.**

Transferrin receptor 1.

Int. J. Biochem. Cell Biol., 36: 2137– 2143.

**Akiyama M., Kysynoki K., Umeki S., Hirai U., Makamura N., Bean M. A., Kyoizumi S., 1992.**

Evaluation of four somatic mutation assays as a biological dosimeter in humans.

In: Dewey W. C., Edington M., Fry R. J. M., Hall E. J., Whitmore G. F. et al., eds. Radiation research: A 20<sup>th</sup> century perspective. New York: Acad. Press: 177-182.

**Akiyama M., Kyoizumi S., Kusunoki Y., Hirai Y., Tanabe K., Cologne J. B., 1996..**

Monitoring Exposure to Atomic Bomb Radiation by Somatic Mutation.

Environ.

Health Perspect., 104 (3):493-496.

**Baum J., Ward R. H., Conway D. J., 2002.**

Natural Selection on the Erythrocyte Surface.

Mol. Biol. Evol. 19(3): 223–229.

**Bayne B. L., Brown D. A., Burns K., Dixon D. R., Ivanovici A., Livingstone D. R., Lowe D. M., Moore M. N., Stebbing A. R. D., Widdows J., 1985.**

The effects of stress and pollution on marine animals.

Prager Scientific.

**Beguin Y., 2003.**

Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status.

Clinica Chimica Acta 329: 9-22.

**Bender J. G., Unverzagt K., Walker D. E., Lee W., Smith S., Williams S., Van Epps D. E., 1994.**

Phenotypic analysis and characterization of CD34+ cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood, and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation.

Clin. Immunol. Immunopathol., 70: 10– 18.

**Bonucci E., 1981.**

Manuale di Istochimica.

Editore Lombardo. Roma. 14-16

**Chen Y., Dertinger S. D., Pandya K., Torous D. K., Brewer K. J., Smudzin T., Miller R. K., 2004.**

Early detection of cytogenetic damage from radiation or chemical agents by flow-cytometric analysis of micronucleated cd71-positive reticulocytes in human peripheral blood.

Int. J. of Radiation Oncology, Biology, Physics, vol. 60(1), suppl. 1, S366-S366.

**Daniels T. R., Delgado T., Rodriguez J. A., Helguera G., Penichet M. L., 2006.**

The transferrin receptor part I: biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer.

Clinical Immunology, 121(2):144-158. Epub 2006.

**Das Gupta A., Shah V. I., 1990.**

Correlation of transferrin receptor expression with histologic grade and immunophenotype in chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma.

Hematol. Pathol., 4: 37– 41.

**de Isla N. G., Riquelme B. D., Rasia R. J., Valverde J. R., Stolz J. F., 2003.**

Quantification of glycophorin A and glycophorin B on normal human RBCs by flow cytometry.

Trasfusion, 43 (8): 1145-52.

**Deaglio S., Capobianco A., Cali A., Bellora F., Alberti F., Righi L., Sapino A., Camaschella C., Malavasi F., 2002.**

Structural, functional, and tissue distribution analysis of human transferrin receptor-2 by murine monoclonal antibodies and a polyclonal antiserum.

Blood, 100: 3782–3789.

**Della Corte F., D'Ippolito S., 1999.**

Fondamenti di ematologia generale e comparata.

Liguori ed., 261-264.

**Depledge M., 1989.**

The rational basis for detection of the early effects of marine pollutants using physiological indicators.

AMBIO, 18:301-302.

**Dertinger S. D., Torous D. K., Hall N. E., Murante F. G., Gleason S. E., Miller R. K., Tometsko C. R., 2002.**

Enumeration of micronucleated CD71-positive human reticulocytes with a single-laser flow cytometer.

Mutation Research 515: 3–14.



**Dertinger S. D., Chen Y., Miller R. K., Brewer K. J., Smudzin T., Torous D. K., Hall N. E., Olvany K. A., Murante F. G., Tometsko C. R., 2003.**

Micronucleated CD71-positive reticulocytes: a blood-based endpoint of cytogenetic damage in humans.

Mutation Research 542: 77–87.

**Gagneux P., Varki A., 1999.**

Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function.

Glycobiology 9: 747–755.

**Gatter K. C., Brown G., Trowbridge I. S., Woolston R. E., Mason D. Y., 1983.**

Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance.

J. Clin. Pathol., 36: 539– 545.

**Glockner G., Scherer S., Schattevoy R., Boright A., Weber J., Tsui L. C., Rosenthal A., 1998.**

Large-scale sequencing of two regions in human chromosome 7q22: analysis of 650 kb of genomic sequence around the EPO and CUTL1 loci reveals 17 genes.

Genome Res., 8: 1060– 1073.

**Glomski C. A., Pica A., 2004.**

Erythrocytes of the Poikilotherms: a phylogenetic Odyssey.

Foxwell & Davies (UK) Limited, ISBN: 8884480108 ISBN-13: 9788884480101.

**Goding J. W., Burns G. F., 1981.**

Monoclonal antibody OKT-9 recognizes the receptor for transferrin on human acute lymphocytic leukemia cells.

J. Immunol., 127: 1256– 1258.

**Gomme P.T., McCann K.B., Bertolini J., 2005.**

Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions.

Drug Discovery Today, 10: 267– 273.

**Gong J. K., Glomski C. A., Guo Y., 1999.**

A lifelong, wide-range radiation biodosimeter: erythrocytes with transferrin receptors.

Health Physics, vol 77, nr. 6, 713-718.

**Grimaldi M.C., D'Ippolito S., Pica A., Della Corte F., 1983.**

Cytochemical identification of the leukocytes of torpedoes (*Torpedo marmorata* Risso and *Torpedo ocellata* Rafinesque).

Bas. Appl. Histochem., 27: 311-317.

- Gross S., Helm K., Gruntmeir J. J., Stillman W. S., Pyatt D. W., Irons R. D., 1997.**  
 Characterization and phenotypic analysis of differentiating CD34+ human bone marrow cells in liquid culture.  
 Eur. J. Haematol., 59: 318– 326.
- Habeshaw J. A., Lister T. A., Stansfeld A. G., Greaves M. F., 1983.**  
 Correlation of transferrin receptor expression with histological class and outcome in non-Hodgkin lymphoma.  
 Lancet, 1: 498– 501.
- Haynes B. F., Hemler M., Cotner T., Mann D. L., Eisenbarth G. S., Strominger J. L., Fauci A. S., 1981.**  
 Characterization of a monoclonal antibody (5E9) that defines a human cell surface antigen of cell activation.  
 J. Immunol., 127: 347– 351.
- Jefferies W. A., Brandon M. R., Williams A. F., Hunt S. V., 1985.**  
 Analysis of lymphopoietic stem cells with a monoclonal antibody to the rat transferrin receptor.  
 Immunology, 54: 333– 341.
- Jonas H., 1979.**  
 Il principio responsabilità. Un'etica per la civiltà tecnologica.  
 Trad. it. di P. Rinaudo, G. Einaudi, Torino, 1993.
- Kawabata H., Yang R., Hirama T., Vuong P. T., Kawano S., Gombart A. F., Koeffler H. P., 1999.**  
 Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family.  
 J. Biol. Chem., 274: 20826– 20832.
- Kawabata H., Germain R. S., Vuong P. T., Nakamaki T., Said J. W., Koeffler H. P., 2000.**  
 Transferrin receptor 2- $\alpha$  supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in vivo.  
 J. Biol. Chem., 275: 16618–16625.
- Kawabata H., Germain R. S., Ikezoe T., Tong X., Green E. M., Gombart A. F., Koeffler H. P., 2001a.**  
 Regulation of expression of murine transferrin receptor 2.  
 Blood, 98: 1949– 1954.

**Kawabata H., Nakamaki T., Ikonomi P., Smith R. D., Germain R. S., Koeffler H. P., 2001b.**

Expression of transferrin receptor 2 in normal and neoplastic hematopoietic cells.  
Blood, 98: 2714– 2719.

**Kondo K, Noguchi M., Mukai K., Matsuno Y., Sato Y., Shimosato Y., Monden Y., 1990.**

Transferrin receptor expression in adenocarcinoma of the lung as a histopathologic indicator of prognosis.  
Chest, 97: 1367–1371.

**Kurten R.C., 2003.**

Sorting motifs in receptor trafficking.  
Adv. Drug Delivery Rev., 55: 1405– 1419.

**Kyoizumi S., Langlois R. G., Bigbee W. L., Nakamura N., Bean M. A., Akiyama M., Jensen R. H., 1987.**

Evidence for increased somatic cell mutations at the Glycophorin A locus in atomic bomb survivors.  
Science, 236: 445-448.

**Kyoizumi S., Kusunoki Y., Hayashi T., Hakoda M., Cologne J. B., Nakachi K., 2005.**

Individual variation of somatic gene mutability in relation to cancer susceptibility: prospective study on erythrocyte Glycophorin A gene mutations of atomic bomb survivors.  
Cancer Res., 65: 5462-5469.

**Kwok J.C., Richardson D.R., 2002.**

The iron metabolism of neoplastic cells: alterations that facilitate proliferation?  
Crit. Rev. Oncol./Hematol., 42: 65– 78.

**Kyoizumi S., Akiyama M., Cologne J. B., Tanabee K. K., Nakamura A. A., Awa U., Hirai U., Kusunolki Y., Umeki S., 1996.**

Somatic cell mutations at the Glycophorin A locus in erythrocyte of atomic bomb survivors: implications for radiation carcinogenesis.  
Radiat. Res., 146: 43-52.

**La Torre M. A., 1998.**

Le ragioni morali dell'ambientalismo  
ESI, Napoli

**Lesley J., Hyman R., Schulte R., Trotter J., 1984.**

Expression of transferrin receptor on murine hematopoietic progenitors.  
Cell. Immunol., 83: 14– 25.

**Li H., Sun H., Qian Z.M., 2002.**

The role of the transferrin—transferrin-receptor system in drug delivery and targeting.  
Trends Pharmacol. Sci., 23: 206– 209.

**Libo Liu, Yuguang Liu, Guangying Ni, Shuzheng Liu, 2009.**

Flow cytometric scoring of micronucleated reticulocytes as a possible high-throughput radiation biodosimeter.  
Environmental and Molecular Mutagenesis. Pubblicato on line.

**Lisowska E., 2001.**

Antigenic properties of human glycoporphins – an update.  
Adv. Exp. Med. Biol, 491: 155-169.

**Little M. P., Weiss H. A., Boice J. D. jr., Darby S. C., Day N. E., Muirhead C. R., 1999.**

Risks of leukemia in Japanese atomic bomb survivors, in women treated for cervical cancer, and in patients treated for ankylosing spondylitis.  
Radiation Research, 152: 280-292.

**McCarthy F., Shugart L. R., 1990.**

Biomarkers of environmental contamination.  
Lewis Pub., Chelsea USA.

**Muzi P., Bologna M., 1999.**

Caleidoscopio italiano. Tecniche di immunoistochimica.  
S. Rassu editore. Bologna.

**Nakamaki T., Kawabata H., Saito B., Matsunawa M., Suzuki J., Adachi D., Tomoyasu S., Phillip Koeffler H., 2004.**

Elevated levels of transferrin receptor 2 mRNA, not transferrin receptor 1 mRNA, are associated with increased survival in acute myeloid leukaemia.  
Br. J. Haematol., 125: 42– 49.

**Neckers L.M., Trepel J.B., 1986.**

Transferrin receptor expression and the control of cell growth.  
Cancer Invest., 4: 461–470.

**NRC, 1989.**

Biologic markers in reproductive toxicology.  
National Academy Press. Washington, D.C.

**Odsjö T., Roos A., Johnels A. G., 2004.**

The tail feathers of osprey nestlings (*Pandion haliaetus* L.) as indicators of change in mercury load in the environment of southern Sweden (1969-1998): a case study with a note on the simultaneous intake of selenium.

AMBIO J Human Environ. vol. 33, p. 133-137.

**Omary M.B., Trowbridge I.S., Minowada J., 1980.**

Human cell surface glycoprotein with unusual properties.

Nature, 286: 888– 891.

**Pantopoulos K., 2004.**

Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update.

Ann. N. Y. Acad. Sci., 1012: 1– 13.

**Pica A., Grimaldi M. C., Della Corte F., 1983.**

The circulating blood cells of torpedoes (*Torpedo marmorata* Risso and *Torpedo ocellata* Rafinesque).

Monitore zool. ital., 17: 353-374.

**Pica A. & Della Corte F., 1987.**

Hemopoiesis, Lymphomieloid Tissues, Spleen and Thymus of *Torpedoes*: in normal conditions and after treatment with cobamamide and folic acid.

Arch. Ital. Anat. Embriol., 92 (4): 249-261.

**Pica A., Grimaldi M. C., Lodato A., 1991.**

The localization and structure of hemopoietic centers from fishes to reptiles, with new observations on *Raja asterias* Delar.

Symposium on the evolution of terrestrial vertebrates. Selected Symposia and Monographs U.Z.I. 4. Mucchi, Modena, 565-574.

**Pica A., Cristino L., Sasso F. L., Guerriero P., 2000.**

Haemopoietic regeneration after autohaemotransplant in sublethal X-irradiated marbled electric rays.

Comparative Haematology International, 10: 43-49.

**Ponka P., Lok C.N., 1999.**

The transferrin receptor: role in health and disease.

Int. J. Biochem. Cell Biol., 31:1111– 1137.

**Prior R., Reifenberger G., Wechsler W., 1990.**

Transferrin receptor expression in tumours of the human nervous system: relation to tumour type, grading and tumour growth fraction.

Virchows Arch., A Pathol. Anat. Histopathol., 416: 491– 496.

**Qian Z.M., Li H., Sun H., Ho K., 2002.**

Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway.  
Pharmacol. Rev., 54: 561– 587.

**Richardson D.R., Ponka P., 1997.**

The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells.

Biochim. Biophys. Acta, 1331: 1– 40.

**Schiestl R. H., Fathia K., Carls N., 1994.**

Reversion of the mouse pink-eyed unstable mutation induced by low doses of x-rays.

Science, 266: 1573-1576.

**Seymour G. J., Walsh M. D., Lavin M. F., Strutton G., Gardiner R. A., 1987.**

Transferrin receptor expression by human bladder transitional cell carcinomas.

Urol. Res., 15: 341–344.

**Sieff C., Bicknell D., Caine G., Robinson J., Lam G., Greaves M. F., 1982.**

Changes in cell surface antigen expression during hemopoietic differentiation.

Blood, 60: 703– 713.

**Shindelman J. E., Ortmeyer A. E., Sussman H. H., 1981.**

Demonstration of the transferrin receptor in human breast cancer tissue. Potential marker for identifying dividing cells.

Int. J. Cancer, 27: 329– 334.

**Smith N.W., Strutton G.M., Walsh M.D., Wright G.R., Seymour G.J., Lavin M.F., Gardiner R.A., 1990.**

Transferrin receptor expression in primary superficial human bladder tumours identifies patients who develop recurrences.

Br. J. Urol., 65: 339–344.

**Sutherland R., Delia D., Schneider C., Newman R., Kemshead J., Greaves M., 1981.**

Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 78: 4515–4519.

**Taetle R., 1990.**

The role of transferrin receptors in hemopoietic cell growth.

Exp. Hematol., 18: 360– 365.

**Trowbridge I.S., 1988.**

Transferrin receptor as a potential therapeutic target.  
Prog. Allergy, 45: 121–146.

**Trowbridge I.S., Collawn J.F., Hopkins C.R., 1993.**

Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway.  
Annu. Rev. Cell Biol., 9: 129– 161.

**Tonik S. E., Shindelman J. E., Sussman H. H., 1986.**

Transferrin receptor is inversely correlated with estrogen receptor in breast cancer.  
Breast Cancer Res. Treat., 7: 71– 76.

**Trinder D., Baker E., 2003.**

Transferrin receptor 2: a new molecule in iron metabolism.  
Int. J. Biochem. Cell Biol., 35: 292– 296.

**Trowbridge I.S., 1988.**

Transferrin receptor as a potential therapeutic target.  
Prog. Allergy, 45: 121–146.

**Walker R. A., Day S. J., 1986.**

Transferrin receptor expression in nonmalignant and malignant human breast tissue.  
J. Pathol., 148: 217– 224.

**Weber M., 1918.**

Conferenze dal titolo: Il lavoro intellettuale come professione.  
Trad. it. di A. Giolitti, G. Einaudi, Torino, 1973.

**Wyffels J. T., Walsh C. J., Luer C. A., Bodine A. B., 2005.**

In vivo exposure of clearnose skates, *Raja eglanteria*, to ionizing X-radiation: acute effects on the thymus.  
Developmental and Comparative Immunology 29, 315–331.

**Yang D. C., Wang F., Elliott R. L., Head J. F., 2001.**

Expression of transferrin receptor and ferritin H-chain mRNA are associated with clinical and histopathological prognostic indicators in breast cancer.  
Anticancer Res., 21: 541–549.

**Yeh C. J., Taylor C. G., Faulk W. P., 1984.**

Transferrin binding by peripheral blood mononuclear cells in human lymphomas, myelomas and leukemias.  
Vox Sang., 46: 217– 223.

**Young M. T., Beckmann R., Toye A. M., Tanner M. J. A., 2000.**

Red-cell Glycophorin A - Band 3 interaction associated with the movement of Band 3 to the cell surface.

*Biochem. J.*, 350: 53-60.

**Zhou Q., Zhang J., Fu J., Shi J., Jiang G., 2008.**

Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem.

*Anal. Chim. Acta*, Jan 14; 606 (2): 135-150. Epub 2007 Nov 19.

## ***Sitografia***

**[1] D'Antuono E.**

Federica e-learning, Università degli Studi di Napoli Federico II, Lezioni di Etica e Bioetica.

In: <http://www.federica.unina.it/sociologia/etica-e-bioetica/il-concetto-di-natura/>

**[2] Comitato Nazionale di Bioetica, 1995**

I Pareri del Comitato.

In: <http://www.governo.it/bioetica/testi/210995.html>

**[3] Caspanello S., 2009**

Giampileri, tutti sapevano: così un anno fa tecnici e geologi avvisavano Procura e Regione.

In: [http://www.tempostretto.it/8/index.php?location=articolo&id\\_articolo=20830](http://www.tempostretto.it/8/index.php?location=articolo&id_articolo=20830)

**[4] Praturlon A., 2004.**

L'etica e l'integrità dell'habitat naturale. Risvolti etici del pensiero geologico.

In: [http://www.babelonline.net/home/005/pdf/03-praturlon-etica\\_e\\_integrita.pdf](http://www.babelonline.net/home/005/pdf/03-praturlon-etica_e_integrita.pdf)

**[5] Pratesi S.**

Bioetica ambientale: dispensa per il corso di formazione insegnanti.

In: [http://www.erasacra.com/aree\\_tematiche/ambiente\\_natura/bioetica/dispensa.htm](http://www.erasacra.com/aree_tematiche/ambiente_natura/bioetica/dispensa.htm)

**[6] Sito ufficiale italiano della Carta della Terra**

<http://www.cartadellaterra.it/>